



**Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et
biologiques du devenir des pesticides dans les sols :
application au transfert du pentachlorophénol en
colonnes**

Joao Martins

► **To cite this version:**

Joao Martins. Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et biologiques du devenir des pesticides dans les sols : application au transfert du pentachlorophénol en colonnes. Interfaces continentales, environnement. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1993. Français. NNT : . tel-00694312

HAL Id: tel-00694312

<https://theses.hal.science/tel-00694312>

Submitted on 4 May 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée par

Joao MARTINS

Maître es Génie Biologique,
Diplomé d'Etudes Approfondies d'Ecologie Microbienne

Pour obtenir le titre de **DOCTEUR** de

L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 23 novembre 1988)

Spécialité: Mécanique

**Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et
biologiques du devenir des pesticides dans les sols :
Application au transfert du Pentachlorophenol en colonnes.**

Date de soutenance: 25 Novembre 1993

Composition du jury:

R. BARDIN	Président
L. JOCTEUR MONROZIER T. VOGEL	Rapporteurs
A. MERMOUD J. P. GAUDET L. CHARLET	Examineurs

**Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Etude des Transferts
en Hydrologie et Environnement (LTHE) INPG - UJF - CNRS (URA 1512)**

*Tout homme qui dirige, qui fait quelque chose a contre lui
ceux qui voudraient faire la même chose,
ceux qui font précisément le contraire,
et surtout la grande armée de gens d'autant plus sévères
qu'ils ne font rien du tout.*

Jules CLARETIE
1840-1913

*A Marie Claire, à mes parents et à mes frères et soeur
à qui je dédie ces quelques années de travail intensif.*

AVANT PROPOS

Ce travail de thèse a été effectué en grande partie au Laboratoire d'étude des Transferts en Hydrologie et Environnement. Certaines expérimentations concernant les études microbiologiques ont été menées dans le Laboratoire de Microbiologie des Sols de Lyon.

Je tiens à remercier Monsieur M. VAUCLIN, pour m'avoir accueilli au sein du groupe hydrologie de l'IMG, devenu au cours de ce travail : le LTHE, dont il est le directeur attentif et accessible.

Je remercie également le Professeur R. BARDIN, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Microbiologie des Sols, et pour avoir accepté la présidence de ce jury.

Je voudrai remercier Lucile JOCTEUR MONROZIER pour sa grande disponibilité, pour ses précieux conseils et surtout pour nos looongues conversations toujours très enrichissantes. Je tiens à la remercier également pour avoir bien voulu accepter la lourde tâche de rapporteur.

Je tiens à exprimer ici toute ma considération au Professeur T. VOGEL, qui n'a pas hésité à effectuer un stage linguistique en France afin de pouvoir être le second rapporteur de ce travail. Je tiens à le remercier également pour son extrême sympathie et sa grande disponibilité "anywhere and at anytime".

Je remercie le Professeur A. MERMOUD, pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse et avec qui je collaborerai certainement dans un futur proche.

Je remercie également le Professeur L. CHARLET, pour ses conseils de chercheur très international mais aussi pour avoir accepté de prendre part à ce Jury.

Monsieur J.P. GAUDET est le responsable scientifique de cette recherche. Je souhaiterai lui exprimer ici ma profonde gratitude pour m'avoir permis d'entrer dans ce laboratoire tout en me rendant la vie toujours facile grâce à sa grande gentillesse et à ses bons conseils. Je le remercie également pour la patience dont il a fait preuve à mon égard tout au long de ce travail et pour avoir su m'intéresser au monde de la micro-informatique sur PC. Je rends hommage à ses qualités de moniteur de tennis qui m'ont permis de faire progresser en parallèle mon jeu et mon travail.

Je remercie le Professeur A. CHALAMET, pour ses bons conseils et sa bonne humeur quotidienne et contagieuse.

Je voudrai remercier Mrs. S. LAMBERT, M. BOURALY, P. ISNARD, J.C. BOUTONNET et C. GUYOT, pour les nombreux et enrichissants contacts et pour les pertinentes remarques émises au cours des diverses réunions d'avancement des travaux durant les 4 ans du projet qui nous liait.

Je remercie également les différents partenaires chercheurs connus dans le cadre de ce projet de recherche pour leurs conseils avertis et leur aide précieuse, en particulier

mes collègues du laboratoire de CNGE de RENNES, du SCA du CNRS de SOLAIZE et du laboratoire d'ECOTOXICOLOGIE (Pharmacie) de GRENOBLE.

Je remercie vivement mes collègues Brésiliens A. Antonino, J. BELLINI, M. BASTOS QUADRI et M. NOVY QUADRI pour le soleil qu'ils ont apporté au laboratoire et pour les très fructueuses discussions entamées durant ces quelques années de travail.

Je remercie aussi L. TESSIER et G.M. SAULNIER pour avoir su apporter au laboratoire plusieurs kilogrammes de bonne humeur, quelques litres d'ambiance chaude le soir dans la salle café, et de nombreux mètres d'humour, voire de rires francs et massifs pas trop encombrants.

Je tiens à remercier également R. LATY, pour ses formidables jeux de mots, de mines, de verres, d'ironie, de mauvaise humeur, du samedi matin, et de lumière. Merci pour la bonne ambiance dans le D et dans le G.

Je remercie l'ensemble du personnel chercheur du LTHE, dont je ne citerai pas le nom afin de n'oublier personne.

Je n'oublierai pas le personnel administratif et technique : Hélène, Sylviane, Odette, Lucien, Jean Michel et Hervé (devenu récemment CoffeeMan).

Je veux remercier tous les chercheurs, administratifs et techniciens du Laboratoire de Microbiologie des Sols de Lyon qui ont rendu mes séjours toujours très sympatiques et animés.

Je remercie D. BERNILLON pour sa gentillesse et l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce travail expérimental.

Je voudrai remercier tout particulièrement MARIE CLAIRE, qui a participé très largement et activement à la finition de ce travail tout en ne laissant traîner que quelques fautes de frappe.

Je remercie également les sociétés RHONE POULENC et ELF-ATOCHEM pour le soutien technique, scientifique et financier qui a permis le développement et l'aboutissement de ce travail.

Je ne veux oublier aucun de mes collègues étudiants des deux laboratoires, je remercie donc sans distinction et dans le désordre : éric, laurent, les 3 sophies, sarah, fella, kabir, françoise, amar, stéphanie, christian, denis, carole, lucas, christine, catherine, cecile, guislaine, jean pierre, philippe, béatrice, Frédérique, agnès, sylvie, marie claire, benoit, patrick, pascal, jean marc, fadhi, georges marie, christophe, pascale, alain, isabelle, eugenio, annita, carlos...

Si d'aventure, certains ne se reconnaissent pas sur cette liste, ne m'en veuillez pas car la faute en incombe forcément à la secrétaire, sans doute partie faire du café.

RESUME

La prédiction du devenir des produits chimiques dans les sols est basée sur la description de nombreux mécanismes dont l'étude est pluridisciplinaire : microbiologie, hydrologie, pédologie, génie des procédés, géochimie et modélisation mathématique. L'approche choisie est de type dynamique des systèmes permettant le découplage des mécanismes sur colonnes de sols en laboratoire, soumises à différentes conditions initiales et aux limites contrôlées. L'étude cible les interactions physico-chimiques, le transport hydrodynamique et la biodégradation du pentachlorophénol (PCP) dans un sol brun lessivé sous culture de maïs et dans un sable. Les principaux mécanismes d'interaction du PCP avec les matrices solides ont été caractérisés en parallèle sur colonne et en systèmes fermés, mettant en évidence l'importance de la matière organique, du pH et de la teneur en eau immobile dans la régulation de ces interactions.

Quatre souches bactériennes capables de dégrader le PCP ont été isolées. Après un an de conservation, ces souches ont perdu leurs capacités de dégradation, ce qui nous a conduit à utiliser une bactérie connue: *Rhodococcus chlorophenolicus* pour l'étude du comportement des microorganismes en microcosmes et en colonnes de sol. Les résultats expérimentaux concernant un traceur de l'écoulement (Cl^-) et le PCP ont été confrontés à une modélisation mathématique pour vérifier les hypothèses émises. Les mécanismes prépondérants que nous avons identifiés sont : le transport convectif, qui varie avec la nature, le degré d'humidité de la matrice solide poreuse et les vitesses d'écoulement de l'eau; les interactions physico-chimiques, qui dépendent du pH et du taux de matière organique; la biodégradation, régulée par de nombreux facteurs biotiques comme la distribution microscopique des microorganismes, les phénomènes d'adaptation ainsi que par la dynamique des populations introduites (prédation et compétition); le transport particulaire qui dépend des variations de composition et de force ionique de la solution du sol et qui peut être très important dans les sols lessivés en cas de forts épisodes pluvieux. Ce dernier mécanisme n'a pas été modélisé.

ABSTRACT

Prediction and assessment of the fate of xenobiotics in soil requires the participation of many different disciplines : microbiology, hydrology, soil science, process engineering, geochemistry and mathematical modeling. Using a system dynamics approach, the different mechanisms associated with the hydrodynamic transport, the physicochemical interactions and the biodegradation of pentachlorophenol (PCP) were successfully identified with the aid of soil columns. These soil columns were either filled with sand or a brown leached soil and were operated with well defined boundary and initial conditions. The major mechanisms of interaction between PCP and the solid matrix were characterized in both batch and column studies demonstrating their dependence on organic matter concentration, pH and the "immobile" water content. We isolated 4 bacterial strains able to utilize the PCP as the sole energy and carbon source. After one year of cryoconservation, these strains lost their degradation capabilities, leading us to employ a well known microorganism : *Rhodococcus chlorophenolicus* for the study of microbial behaviour in column and batch (microcosms). Experimental results concerning hydrodynamic behaviour, as studied by use of a chloride tracer and the fate of PCP in columns have been compared with results from mathematical modelling in order to verify hypothesis. The processes identified as being major contributors to the laboratory observations are : The convective transport, which varies with the nature and the water content of the porous solid matrix and the water flow. The physico-chemical interactions, pH and organic carbon content dependent. The biodegradation, regulated by many biotic factors such as microscopic microbial distribution, adaptation phenomenon, introduced population dynamics (predation and competition), and abiotic factors such as chemical toxicity, water and oxygen content...The particle transport, which is influenced by the soil solution composition and ionic strength variation and can be very important in leached soils in case of intensive rains. This last mechanism has not been modelised.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Cadre de l'étude	6

Chapitre I

Les aspects physico-chimiques du devenir des pesticides dans les sols : revue et synthèse bibliographique

Introduction.....	7
I-1 Position du problème	11
I-2 Les processus de rétention	12
I-3 Estimation et représentation de la fixation.....	32
Conclusion.....	41

Chapitre II

Les sols et la molécule organique : choix pratiques et principales caractéristiques physico-chimiques

Introduction.....	43
II-1 Choix de la molécule organique et des sols.....	44
II-2 Estimation et représentation de la fixation.....	54
Conclusion.....	73

Chapitre III

Les aspects biologiques du devenir des produits chimiques dans les sols : revue et synthèse bibliographique

Introduction.....	75
III-1 Les microorganismes dans les sols	77
III-2 Les processus de biodégradation	100
III-3 Modélisation de la biodégradation des pesticides	123
Conclusion.....	133

Chapitre IV

Les aspects microbiologiques du devenir du PCP dans les sols : essais en microcosmes et en colonnes de sol

Introduction.....	135
A/ Enrichissement du sol en microflore adaptée, isolement de bactéries utilisant le PCP	136
B/ Choix et comportement dans le sol d'un microorganisme compétant pour la dégradation du PCP	160
Conclusion.....	194

Chapitre V

Transferts sur colonnes : traceur de l'écoulement, molécule organique, interactions et biodégradation

Position du problème et approche suivie	197
A/ Considérations générales sur les transferts d'eau et de solutés dans les sols.....	200
B/ Les dispositifs expérimentaux	214
C/ Résultats et discussions.....	222
Conclusion.....	280
Conclusion générale	284
Références bibliographiques.....	289
Annexes.....	307

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
Cadre de l'étude	6
Chapitre I	
Les aspects physico-chimiques du devenir des pesticides dans les sols : revue et synthèse bibliographique	
Introduction	8
I-1 Position du problème	11
I-2 Les processus de rétention	12
I-2-1 Les principaux mécanismes	12
I-2-1-1 Les forces de London Van der Waals	13
I-2-1-2 Les liaisons hydrogène	13
I-2-1-3 Les ponts cationiques et hydriques	14
I-2-1-4 Interaction électrostatique en ions de charge opposée	14
I-2-1-5 L'échange de ligand	15
I-2-1-6 Liaison par transfert de charge	15
I-2-1-7 Les liaisons de coordination	16
I-2-1-8 Les liaisons hydrophobes.....	16
I-2-1-9 Les liaisons covalentes.....	16
I-2-2 Les paramètres physico-chimiques impliqués	17
I-2-2-1 La nature de la molécule xénobiotique	18
I-2-2-2 La nature de la solution du sol	24
I-2-2-3 La nature de la matrice solide	28
I-2-2-3-1 Les constituants minéraux	28
I-2-2-3-2 Les constituants organiques	30
I-2-2-3-3 La structure du sol.....	31
I-3 Estimation et représentation de la fixation.....	32
I-3-1 Etude de l'équilibre	33
I-3-2 Les cinétiques de transfert de matière entre phases	37
I-3-3 Effet de la présence d'un écoulement	40

Chapitre II

Les sols et la molécule organique : choix pratiques et principales caractéristiques physico-chimiques

Introduction	43
II-1 Choix de la molécule organique et des sols	44
II-1-1 Les sols modèles	44
II-1-1-1 Le sable	44
II-1-1-2 Le sol brun lessivé sous prairie	45
II-1-1-3 Le sol brun lessivé sous culture	46
II-1-2 La molécule modèle	48
II-1-2-1 Pourquoi le PENTACHLOROPHENOL?	48
II-1-2-2 Principales utilisations et formulations du PCP	49
II-1-2-3 Toxicité du PCP	50

II-1-2-4	Préparation des solutions de PCP.....	52
II-1-2-5	Les méthodes analytiques.....	53
II-2	Estimation et représentation de la fixation.....	54
II-2-1	Les principales propriétés physico-chimiques du PCP.....	54
II-2-2	Les principaux mécanismes d'interactions connus.....	56
II-2-3	Mesure des principales propriétés physico-chimiques du PCP	59
II-2-3-1	Effet du pH sur la solubilité	60
II-2-3-2	Effet de la force ionique et de la nature des ions en solution sur la solubilité du PCP	61
II-2-3-3	Effet des groupements fonctionnels sur la solubilité du PCP	61
II-2-4	Estimation de la fixation du PCP sur différents adsorbants	63
II-2-4-1	Fixation du PCP sur le sable de Fontainebleau	63
II-2-4-2	Fixation du PCP sur l'argile	64
II-2-4-3	Fixation du PCP sur les acides humiques.....	65
II-2-4-4	Fixation du PCP sur le sol de la Côte Saint André.....	66
a/	Etude de l'équilibre.....	66
b/	Etude de la cinétique	70
1/	Cinétique d'adsorption	70
2/	Cinétique de désorption	71
II-2-4-5	Estimation de la fixation du 2, 3, 5, 6, TeCP	72
	CONCLUSION	73

Chapitre III

Les aspects biologiques du devenir des produits chimiques dans les sols : revue et synthèse bibliographique

Introduction	76
III-1 Les microorganismes dans les sols	77
III-1-1 Nature des microorganismes.....	77
III-1-2 Distribution verticale des microorganismes.....	77
III-1-3 Distribution microscopique	78
III-1-4 Influence des microenvironnements et des facteurs	
abiotiques sur les activités microbiennes	85
III-1-4-1 le microenvironnement	85
III-1-4-2 Les paramètres hydriques	87
III-1-4-3 Effet du pH.....	90
III-1-4-4 Le potentiel d'oxydoréduction	92
III-1-4-5 La température.....	94
III-1-5 Devenir des populations introduites dans les sols	96
III-2 Les processus de biodégradation	100
III-2-1 Le phénomène d'adaptation à la dégradation des	
xénobiotiques	100
III-2-1-1 Les mécanismes de l'adaptation	100
III-2-1-2 Les supports de l'adaptation	103

III

III-2-2 Les principaux processus de transformation	107
III-2-2-1 La biodégradation spécifique (minéralisation)	108
III-2-2-2 Le métabolisme accidentel (cométabolisme)	108
III-2-2-3 La polymérisation	109
III-2-2-4 L'accumulation cellulaire des pesticides	109
III-2-2-5 La biodégradation non enzymatique	110
III-2-3 Les principales réactions biochimiques du métabolisme des pesticides	111
III-2-3-1 Les processus d'hydrolyse	111
III-2-3-2 Les réactions de réduction	111
III-2-3-3 Les réactions d'oxydation des xénobiotiques	112
III-2-3-4 Les autres types de réactions	113
III-2-4 La dégradation des molécules organohalogénés aromatiques	114
III-2-4-1 Entrée de la molécule dans la cellule bactérienne	114
III-2-4-2 Transformation et dégradation des substituants de la molécule	114
III-2-4-3 Activation du cycle aromatique	115
III-2-4-4 Clivage du cycle aromatique	116
III-2-5 Aspects biotechnologiques du métabolisme des pesticides	118
III-2-5-1 Utilisation de microorganismes et d'enzymes pour le traitement de sols pollués	118
III-2-5-2 Obtention de microorganismes adaptés	119
III-3 Modélisation de la biodégradation des pesticides	122
III-3-1 Modélisation de la biodégradation en phase liquide	123
III-3-2 Introduction d'une inhibition due au substrat	128
III-3-3 Introduction d'une dynamique de population	129
III-3-4 Modèle prenant en compte l'inhibition par des cosubstrats et une dynamique de population	130
III-3-5 Prise en compte de la diffusion vers des agrégats	130
CONCLUSION	133

Chapitre IV

Les aspects microbiologiques du devenir du PCP dans les sols : essais en microcosmes et en colonnes

Introduction	135
A/ ENRICHISSEMENT DU SOL EN MICROFLORE ADAPTEE ET ISOLEMENT DE BACTERIES DEGRADANT LE PCP.	136
IV-1 Phase d'enrichissement du sol	136
IV-1-1 Conditions expérimentales	136
IV-1-1-1 Le dispositif d'enrichissement	136
IV-1-1-2 Fonctionnement du dispositif d'enrichissement	137
IV-1-1-3 Les principaux paramètres suivis	138
b/ Suivi du carbone organique soluble et du pH de la solution du sol	138
c/ Suivi de la biomasse microbienne du sol	138

IV

IV-1-2 Résultats.....	140
IV-1-2-1 Suivi de la phase d'enrichissement du sol	140
IV-1-2-2 Effet du PCP sur la biomasse microbienne	142
IV-1-3 Discussion.....	143
IV-2 Mise en évidence de l'enrichissement du sol en microorganismes adaptés.....	145
IV-2-1 Sélection et isolement de microorganismes adaptés à la dégradation du PCP.	145
IV-2-1-1 Conditions expérimentales.....	145
a/ Les milieux de culture	145
b/ Mode opératoire	146
IV-2-1-2 Caractérisation des souches bactériennes sélectionnées.....	147
a/ Détermination des grams.....	147
b/ Etude morphologique.....	147
c/ Identification des souches	147
d/ Profils plasmidiques des souches.....	148
IV-2-1-3 Résultats	148
a/ Obtention des bactéries adaptées	148
b/ Caractéristiques morphologiques et physiologiques	148
c/ Caractérisation plasmidique	149
d/ Identification des souches	150
e/ Evaluation des capacités cataboliques des souches isolées.	150
1/ Tests sur boîte.....	150
2/ Tests en milieu liquide.....	152
IV-2-2 Evolution des populations adaptées au cours de l'enrichissement.....	153
IV-2-2-1 Obtention d'un marquage spécifique des souches sélectionnées.....	153
a/ Technique de préparation des sérums antibactériens	153
b/ Technique de dénombrement par immunofluorescence indirecte (Steinberg 1989).	153
c/ Technique du dénombrement de la microflore totale du sol.....	154
d/ Numération des cellules	155
IV.2.2.2 Vérification de la spécificité des sérums	156
IV.2.2.3 Evolution de la taille des populations dégradantes	156
IV-2-3 Discussion.....	157
IV-2-3-1 La sélection de bactéries adaptées.....	157
IV-2-3-2 Marquage des souches isolées	158
B/ CHOIX ET COMPORTEMENT DANS LE SOL D'UN MICROORGANISME COMPETENT POUR LA DEGRADATION DU PCP.....	160
IV-1 Le microorganisme modèle	160
IV-1-1 Choix du microorganisme modèle.....	160
IV-1-2 Les principales caractéristiques de <i>Rhodococcus chlorophenolicus</i>	162

IV-1-2-1	Caractéristiques morphologiques et biochimiques.....	162
IV-1-2-2	Les capacités cataboliques	164
IV-1-2-3	Caractérisation plasmidique de <i>R. chlorophenolicus</i>	167
IV-1-3	Discussion.....	168
IV-2	Survie de <i>R. chlorophenolicus</i> en microcosmes de sol stérile	171
IV-2-1	Les conditions expérimentales	172
IV-2-1-1	Les microcosmes	172
IV-2-1-2	Inoculation des microcosmes, extraction et	
	dénombrement des bactéries	172
IV-2-2	Résultats.....	174
IV-2-2-1	Survie de <i>R. chlorophenolicus</i> en microcosmes de 5 g.....	174
a/	Effet de la taille de l'inoculum	174
b/	Effet de la teneur en eau.....	174
c/	Effet du pentachlorophénol.....	176
IV-2-2-2	Survie de <i>R. chlorophenolicus</i> en microcosmes de	
	30g de sol.....	177
a/	Effet de la teneur en eau	177
b/	Effet de la concentration en PCP	178
IV-2-3	Discussion.....	180
IV-3	Survie de <i>R. chlorophenolicus</i> en sol non stérile.....	182
IV-3-1	Résultats.....	183
IV-3-1-1	Obtention d'un marquage spécifique de <i>R. chlorophenolicus</i>	183
IV-3-1-2	Survie de <i>R. chlorophenolicus</i> en microcosmes de sol non stérile	184
IV-3-2	Discussion.....	185
IV-4	Devenir de <i>R. chlorophenolicus</i> en colonnes de sol.....	187
IV-4-1	Les conditions expérimentales	187
IV-4-1-1	Inoculation du sol.....	187
IV-4-1-2	Les colonnes de sol.....	188
IV-4-1-3	Extraction et dénombrement des microorganismes	188
IV-4-2	Résultats.....	189
IV-4-2-1	Evaluation du transport de <i>R. chlorophenolicus</i> par l'eau de percolation	189
IV-4-2-2	Evolution de la distribution verticale de	
	<i>R. chlorophenolicus</i> au cours du transfert de PCP.....	190
IV-4-3	Discussion.....	191
Conclusion.....		196

Chapitre V

Transferts sur colonnes : traceur de l'écoulement, molécule organique, interactions et biodégradation

Position du problème et approche suivie.....	197
A/ CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES TRANSFERTS D'EAU ET DE SOLUTES DANS LES SOLS	200
V-1 Modélisation de l'écoulement de l'eau.....	200

V-1-1	Conservation de masse de l'eau	200
V-1-2	L'équation dynamique	201
V-1-3	Equation générale de l'écoulement de l'eau	202
V-1-4	Le domaine d'étude	202
V-2	Modélisation du transfert de solutés	204
V-3	Caractérisation de l'hydrodynamique	206
V-4	Caractérisation des interactions du soluté avec la matrice solide	208
V-5	Identification des paramètres	210
V-5-1	Adimensionnalisation des équations	211
V-5-2	Méthodologie de l'identification des paramètres	212
B/	LES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX	214
V-1	Le support expérimental pour les colonnes saturées en eau	214
V-1-1	Les principaux éléments	214
V-1-2	Fonctionnement du dispositif	215
V-2	Le support expérimental pour les colonnes non saturées en eau	216
V-2-1	Technique de mesure de la teneur en eau	216
V-2-2	Fonctionnement du dispositif expérimental	217
V-3	Les caractéristiques des colonnes	218
V-3-1	En conditions de saturation en eau	219
V-3-1-1	Mesure de la densité sèche et de la teneur en eau	219
V-3-1-2	Mesure de la teneur en eau	219
V-3-2	En conditions de saturation partielle	219
C/	RESULTATS ET DISCUSSIONS	222
V-1	Transferts à travers la colonne de sable saturée	222
V-1-1	Analyse des données expérimentales	222
V-1-1-1	Transfert de KCl	222
V-1-1-2	Discussion	231
V-1-2	Transfert de PCP	232
V-1-2-1	Erreurs de mesures et choix d'une taille de créneau	232
V-1-2-2	Discussion	244
V-2	Transferts dans le sableensemencé avec R. chlorophenolicus	245
V-2-1	Conditions expérimentales	245
V-2-2	Essais avec le premier bioréacteur	247
V-2-2-1	Transfert de KCl	247
V-2-2-2	Transfert de PCP	249
V-2-3	Essais avec le second bioréacteur	253
V-2-4	Discussion	259
V-3	Transferts dans le sol cultivé	262
V-3-1	Transfert du traceur	262
V-3-2	Transfert de PCP	265
V-3-2-1	Effet de la stérilisation du sol	265
V-3-2-2	Effet de la concentration en PCP	268
V-3-2-3	Effet de l'introduction de R. chlorophenolicus dans le sol	270
V-3-3	Discussion	275
	Conclusion	282
	Conclusion générale	286
	Références bibliographiques	289
	Annexes	307

LISTE DES PRINCIPAUX SYMBOLES UTILISES

Symboles	Définition	Unités
BCF	facteur de bioconcentration	
C	concentration du soluté dans la phase liquide	g.cm^{-3}
C_0	concentration du soluté dans le créneau	g.cm^{-3}
C_e	concentration du soluté à l'équilibre	g.cm^{-3}
C_i	concentration initiale du soluté	g.cm^{-3}
C_{im}	concentration dans l'eau immobile	g.cm^{-3}
C_m	concentration dans l'eau mobile	g.cm^{-3}
C'	concentration à l'interface externe du grain	g.cm^{-3}
dz	incrément d'espace	cm
D	coefficient de dispersion hydrodynamique	$\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$
D_0	coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans l'eau libre	$\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$
D_{im}	est le coefficient de dispersion dans l'eau immobile	$\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$
D_m	est le coefficient de dispersion dans l'eau mobile	$\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$
f	fraction d'eau mobile	
f'	fraction d'eau mobile en contact avec le solide	
foc	fraction de carbone organique du sol	
h	"pression" de l'eau du sol	cm
H	potentiel matriciel de l'eau du sol	cm
K	conductivité hydraulique	cm.h^{-1}
K_d	coefficient de distribution	$\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$
K_{oc}	coefficient de partage eau/carbone organique	$\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$
K_{ow}	coefficient de partage octanol/eau	
L	longueur de la colonne	cm
m	masse du milieu poreux contenu dans la colonne	g
n	porosité du milieu	
N	exposant de l'isotherme de Freundlich	
N	comptage du nombre de photons	nombre de chocs(cps)
N_0	taux de comptage du porte-échantillon vide	cps.h^{-1}
N_0'	taux de comptage avant l'absorption	cps.h^{-1}
N_{eau}	taux de comptage à travers la colonne remplie d'eau	cps.h^{-1}
N_s	taux de comptage sur le sol sec	cps.h^{-1}
N_{vide}	taux de comptage à travers la colonne vide	cps.h^{-1}
N_w	taux de comptage à travers le sol humide	cps.h^{-1}
Pe	nombre de Péclet	
PM	poids moléculaire	g.mol^{-1}
R	facteur de retard	
S	concentration sur le solide	g.g^{-1}
S	solubilité du soluté dans l'eau	g.cm^{-3}
t	temps	h
t_a	temps d'adsorption	h
t_e	temps du transfert externe	h
t_i	temps du transfert interne	h

VIII

T_M	temps caractéristique de transfert de matière	h
TR	taux de récupération du soluté	%
v	vitesse moyenne d'écoulement.....	cm.h ⁻¹
v_m	la vitesse de pore moyenne dans la fraction mobile	cm.h ⁻¹
V	volume écoulé	cm ³
V_0	volume d'eau contenue dans la colonne.....	cm ³
V_p	volume poral.....	cm ³
V_T	est le volume total occupé par la hauteur L du milieu poreux	cm ³
x	épaisseur de l'échantillon.....	cm
z	coordonnée spatiale.....	cm

α	coefficient d'échange eau mobile/eau immobile	h ⁻¹
δ	épaisseur de la couche limite.....	cm
Δt	incrément de temps	h
ϕ_j^i	sont les termes de source et/ou puits	g.cm ⁻³ h ⁻¹
μ	constante de vitesse de réaction.....	h ⁻¹
μ_C	coefficient massique d'absorption porte échantillon	cm ² .g ⁻¹
μ_S	coefficient massique d'absorption du sol.....	cm ² .g ⁻¹
μ_W	coefficient massique d'absorption de l'eau	cm ² .g ⁻¹
θ	teneur en eau volumique totale.....	cm ³ .cm ⁻³
θ_{im}	teneur en eau volumique de la fraction immobile	cm ³ .cm ⁻³
θ_m	teneur en eau volumique de la fraction mobile	cm ³ .cm ⁻³
ρ_d	masse volumique sèche du milieu	g.cm ⁻³
ρ_S	masse volumique du matériel	g.cm ⁻³
ρ_W	masse volumique de l'eau	g.cm ⁻³
σ	écart-type	
ω	coefficient d'échange adimensionnel	
ψ	coefficient de vitesse de disparition d'ordre un adimensionnel	

NOTA : Seuls les symboles importants communs à tout le texte, ont été portés ici. D'autres symboles ont été utilisés, parfois plusieurs fois pour des significations différentes, mais leur emploi et leur définition sont précisés à chacune de leur apparition.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'introduction volontaire ou accidentelle de produits chimiques dans les sols peut entraîner pour l'environnement des risques majeurs encore mal évalués : soit de contamination directe des milieux environnants, nappe phréatique ou atmosphère, soit par un effet sur les organismes vivants dans les sols agissant ainsi indirectement sur l'homme via les chaînes alimentaires.

Pour ces raisons, le devenir des xénobiotiques a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, en particulier dans les milieux aquatiques et aériens (Pignatello et al. 1986, Munoz 1992, Brockway et al. 1984). Les études sur les sols restent partielles, pour la plupart (Coste et al. 1984, Scheunert et al. 1986) et font généralement abstraction, par souci de simplification, de processus qui, sous certaines conditions naturelles, peuvent être primordiaux, c'est le cas notamment de la biodégradation pour les physiciens du sol ou du transport hydrodynamique des xénobiotiques pour les biologistes. Néanmoins, les voies générales du devenir de ces produits dans les sols ont pu être établies et on a pu se rendre compte en particulier de l'importance de la structure chimique des polluants et des facteurs pédoclimatiques tels que la température, la teneur en eau, le pH, l'aération, l'éclairement ainsi que de l'activité biologique et de la nature du sol (Seiber 1987). Chacun de ces facteurs peut affecter un processus le rendant éventuellement prépondérant suivant la nature du polluant, c'est le cas par exemple de la dégradation chimique pour le propysamide (Coste et al. 1984) ou de la biodégradation pour le 2,4D (Fournier 1989).

On est alors confronté à des situations complexes et variables qui ne peuvent être comprises et à terme prédites (condition nécessaire à une éventuelle réhabilitation), que par l'assimilation de connaissances faisant appel à des disciplines très diverses comme le génie des procédés, la microbiologie, la pédologie, dans ses aspects physiques, chimiques et biologiques ou encore la modélisation mathématique. La mise en oeuvre de travaux sur le sol nécessite donc une interdisciplinarité qui n'est pas toujours rencontrée dans les études décrites dans la littérature,

certainement en raison des difficultés de mise en place de groupes de travail pluridisciplinaires.

Certains cas pratiques sont très complexes. Ils concernent notamment les produits ionisables, très volatils ou induisant la formation de résidus liés relargués de manière incontrôlée. Il est donc indispensable d'étudier les aspects fondamentaux impliqués dans ces phénomènes.

Il est nécessaire de comprendre et d'identifier les principaux mécanismes impliqués dans le comportement d'une molécule pour les modéliser correctement. Cette compréhension passe par la mise au point de méthodologies permettant le découplage des études. Ces méthodologies devront être transposables à l'étude d'autres cas de xénobiotiques et de sols.

Pour cela, l'échelle d'observation est réduite en passant du terrain à l'échelle macroscopique (colonnes de laboratoire) où le découplage des études peut être effectué, en maîtrisant notamment les conditions initiales et aux limites (figure 1)

L'utilisation de ces systèmes dynamiques permet d'identifier les mécanismes correspondant aux principaux processus impliqués dans le comportement d'un pesticide modèle au cours de son transfert dans le sol. L'identification et la quantification de ces processus étant effectuée grâce à l'analyse des courbes de restitution du polluant et d'un soluté non interactif injecté à travers une colonne de sol sous forme de créneau de concentration (figure 2).

L'identification et la compréhension des différents processus hydrodynamiques, physico-chimiques ou biologiques gouvernant le devenir d'une molécule organique introduite de manière diffuse dans un sol, nécessite l'acquisition et l'assimilation de connaissances faisant appel à chacune de ces disciplines.

Pour cette raison, nous avons choisi d'adopter dans ce travail une présentation séparant les différents aspects concernés avec un rappel et une synthèse des acquis.

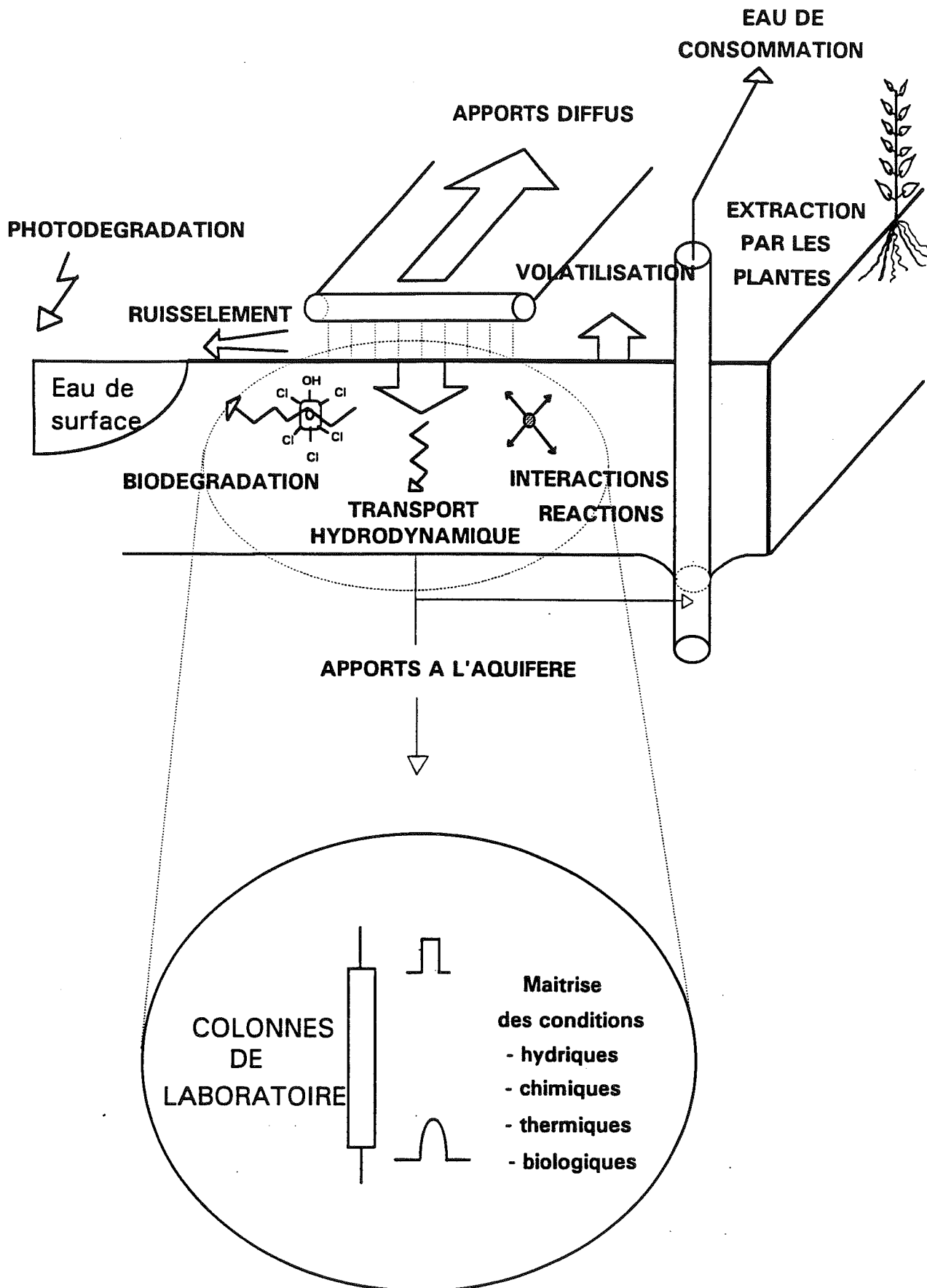


Figure 1

TRANSPORT HYDRODYNAMIQUE

CONVECTION

$$-\frac{\partial qC}{\partial z}$$

DISPERSION

$$\frac{\partial \left[D\theta \frac{\partial C}{\partial z} \right]}{\partial z}$$

PARTITION EAU MOBILE-EAU IMMOBILE

$$\theta = \theta_m + \theta_{im}$$

BIODEGRADATION

POPULATION BACTERIENNE

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \mu X$$

DISPONIBILITE EN SUBSTRAT

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\mu_{max} C}{K_m + C}$$

FACTEURS LIMITANTS (χ)

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\mu_{max} C}{K_m + C} \frac{1}{\chi}$$

INTERACTIONS/REACTIONS

PARTITION SOLIDE/LIQUIDE

$$C_s = f(C_e)$$

CINETIQUE

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = f(S, \theta_m, q, \dots)$$

SOLUBILITE (IONISATION DEPENDANTE DU PH)

$$S = f(pH)$$

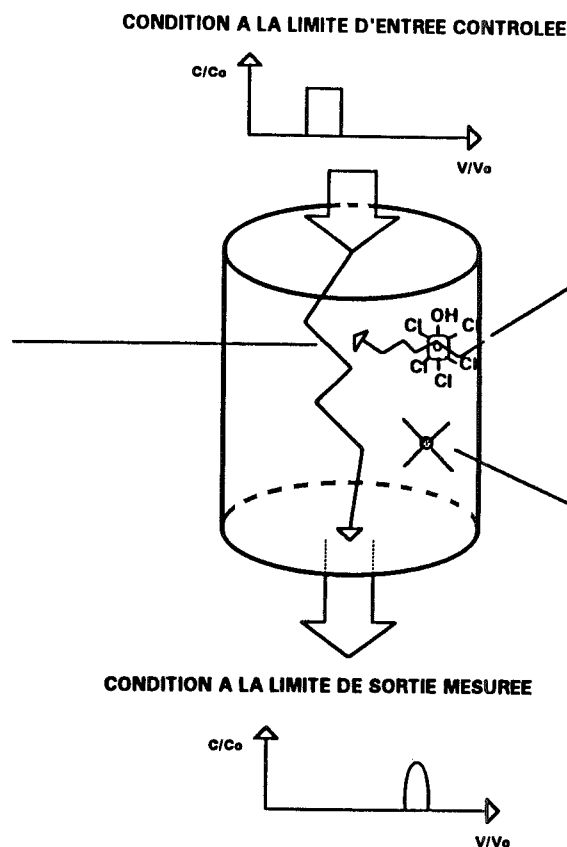


Figure 2

Les revues bibliographiques et leur synthèse présentées dans les chapitres I (pour la physico-chimie) et III (pour la biologie) sont volontairement assez largement développées, parfois même avec des notions de base, pour positionner l'approche pour des non spécialistes de chaque domaine d'étude.

Les choix des supports poreux et de la molécule organique sont fixés par des contraintes méthodologiques (découplage des mécanismes), technologiques (méthodes d'analyse, limites de détection, débits réalisables...) et économiques (durée des expériences, nombre d'analyses...). Ces choix ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de la molécule organique (Pentachlorophenol : PCP) et des supports poreux de l'écoulement (sable de Fontainebleau, sols bruns lessivés) sont développés dans le chapitre II.

Les aspects biologiques liés aux choix effectués sont présentés au chapitre IV, où sont précisés la méthodologie pour obtenir, sélectionner et isoler des bactéries dégradant la molécule modèle ainsi que l'identification et la caractérisation d'une de ces bactéries spécifiques. Nous nous intéresserons également à l'étude du comportement de cette bactérie lors de sa réintroduction dans le sol.

Enfin le chapitre V est dédié à la présentation de résultats plus globaux regroupant les différentes composantes (hydrodynamique, interactions, biodégradation), en sollicitant différents sols par des conditions de transfert contrôlées.

L'hydrodynamique est caractérisée à l'aide d'un traceur de l'écoulement (ion chlorure) et les interactions du pesticide sont étudiées sur une matrice minérale "simple" (sable), sur une biomasse bactérienne introduite dans le sable, et sur un sol naturel prélevé.

Par ailleurs, la biodégradation de la molécule organique est étudiée à l'aide de bioréacteurs et du sol cultivé ensemencé par la bactérie compétente pour la dégradation du PCP, décrite au chapitre IV.

Tout au long de ce travail, nous avons essayé de donner une modélisation mathématique des principaux phénomènes étudiés, cependant la modélisation n'est résolue et confrontée aux résultats expérimentaux que dans le chapitre V.

Le fait de mener conjointement expériences et modélisation permet de contrôler les hypothèses émises et d'identifier, si possible, les paramètres correspondants.

CADRE DE L'ETUDE

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche mis en place à la suite d'un appel d'offre du Ministère de la Recherche et de la Technologie auquel ont répondu deux industriels de la chimie et six laboratoires universitaires :

- La Société Nationale Elf-Aquitaine (SNEA)-Atochem
- La Société Rhône Poulenc
- Le Laboratoire de Toxicologie et Ecotoxicologie de la faculté de pharmacie de Grenoble
- Le Laboratoire de Biologie et Biochimie Appliquées de l'Université de Savoie, Chambéry
- Le Laboratoire de Photochimie de L'université de Clermont Ferrand (URA CNRS 433)
- Le Laboratoire de Chimie des Nuisances et Génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes
- Le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'Université de Lyon I (URA CNRS 1450)
- Le Groupe Hydrologie de l'Institut de Mécanique de Grenoble (IMG) (UMR 101 CNRS/INPG/UJF) devenu le Laboratoire d'Etude des Transferts en Hydrologie et Environnement (URA CNRS INPG/UJF 1512)

Ce projet de recherche était basé sur deux thèmes principaux :

L'impact des produits chimiques sur le milieu aquatique (Systèmes aquatiques) et le devenir des produits chimiques dans les sols (Groupe sols)

Le travail présenté dans ce mémoire rentre dans le cadre du second thème de recherche dont l'objectif principal était la mise au point d'une méthodologie transposable, permettant de comprendre les processus intervenant dans le devenir d'un produit chimique modèle dans un sol modèle. Cette étude est basée sur l'emploi de colonnes de sols remaniés permettant de travailler à une échelle intermédiaire entre l'échelle de terrain et l'échelle microscopique tout en faisant de fréquents aller-retour d'une échelle à l'autre suivant la nature du problème rencontré. Les colonnes de laboratoire permettent en outre de maîtriser les conditions aux limites imposées : hydriques, thermiques et apports des solutés.

CHAPITRE I

LES ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES DU DEVENIR DES PESTICIDES DANS LES SOLS : REVUE ET SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Parmi les processus intervenant dans le comportement des xénobiotiques introduits dans les sols, les phénomènes d'interactions avec les matrices poreuses sont parmi les plus importants, puisqu'ils vont conditionner l'aptitude de ces molécules à être mobilisées par l'eau du sol (Van Genuchten et al., 1976, Graham-Bryce, 1980) et ainsi à polluer les eaux souterraines. Il apparaît donc primordial de pouvoir comprendre la nature des interactions intervenant entre un soluté donné et un absorbant donné si l'on veut pouvoir représenter correctement ces interactions.

Mais on se rend compte qu'un tel objectif est relativement difficile à atteindre dans la mesure où l'on est confronté à des contraintes comme la complexité et la variabilité spatio-temporelle des milieux poreux naturels, la grande diversité des produits chimiques disséminés dans l'environnement, mais aussi le coût financier et en temps d'une expérimentation fine nécessaire pour chaque cas rencontré (Schweich, 1986). De plus, un grand nombre de paramètres vont avoir un effet direct sur le comportement de ces molécules, ce sera le cas en particulier du pH, de la teneur en matière organique, de la structure et de la texture du sol, de son aération donc de sa teneur en eau ou encore du régime hydrique influant sur les vitesses de transfert, ou des pratiques culturales (Calvet et al. 1980).

Pour ces raisons, la majorité des études récentes dans ce domaine sont basées sur une approche systémique prédictive et non plus sur une approche microscopique explicative (Laudelout and Schweich, 1986). Cette approche systémique consiste à établir des lois de comportement très générales permettant la distinction de plusieurs classes de processus mais en conservant un pouvoir prédictif satisfaisant.

Les phénomènes de rétention ou de fixation des produits chimiques correspondent essentiellement aux processus d'adsorption au sens large et d'absorption par la matrice solide ou par les organismes du sol et en particulier les plantes ou les microorganismes (Koskinen and Harper, 1990).

Cependant, une majorité d'auteurs assimilent ces phénomènes de rétention à la fixation (sorption) des molécules sur les surfaces solides (incluant alors les phénomènes d'absorption et de précipitation), surtout en

raison des difficultés à faire la distinction entre de l'adsorption vraie (interactions réversibles de faible énergie entraînant la formation de couches moléculaires à la surface d'une particule de sol), de la précipitation, des liaisons covalentes ou encore de l'absorption par la matière organique ou l'adsorption et absorption par les microorganismes (Koskinen and Harper, 1990).

Pour ces raisons, l'étude du devenir physico-chimique d'une molécule introduite dans un sol est souvent réduite à l'étude des mécanismes d'interaction solide-liquide mis en jeu. L'expérience ayant plus ou moins validé cette vision réductrice des phénomènes, on a cherché alors à les représenter le plus simplement possible mais toujours en accord avec l'expérience (approche phénoménologique).

C'est ainsi que sont apparues de nombreuses relations empiriques comme par exemple le modèle de Freundlich faisant apparaître des paramètres macroscopiques très commodes d'utilisation mais pas forcément représentatifs de la réalité. Non pas parce que ces modèles sont inadaptés, mais plutôt parce que l'expérimentateur n'a pas pu dégager le mécanisme intervenant effectivement. La représentation obtenue peut être due à plusieurs mécanismes pouvant entraîner des comportements tout à fait différents sur le terrain (Laudelout and Schweich 1986).

D'une façon générale, l'estimation de ces paramètres plutôt macroscopiques, ne donnera qu'une représentation biaisée de la réalité, dans la mesure où ces coefficients sont obtenus par définition en conditions d'équilibre (Calvet et al. 1980) alors que les interactions survenant au cours du transport d'un produit chimique suivront la plupart du temps des lois cinétiques (Green and Karickhoff 1990). En effet, les mécanismes de transport peuvent être assimilés à des processus chromatographiques très complexes (Barnes 1989) au cours desquels interviennent les interactions avec les matrices solides retardant ainsi les molécules et conduisant dans le meilleur des cas à une rétention totale du produit par le sol (pouvoir épurateur).

La caractérisation puis la quantification des phénomènes cinétiques doivent donc logiquement venir compléter les lois d'équilibre pour pouvoir décrire au mieux les interactions liquide-solide dans le cadre de la modélisation de ces phénomènes.

Nous nous proposons donc, dans ce chapitre, de rappeler les principaux mécanismes d'interaction solide-liquide ainsi que l'effet de certains facteurs sur ces processus. Nous préciserons également les

paramètres utilisés classiquement pour prédire le comportement des composés chimiques dans les milieux naturels, et dans quelle mesure ces paramètres pourront être utilisés pour la suite de l'étude, dans le cadre de la modélisation des phénomènes de rétention.

Nous essaierons en particulier de préciser les principales lois décrivant l'adsorption à l'équilibre ainsi que les lois cinétiques, et dans quelles mesures elles peuvent être utilisées pour décrire les phénomènes de fixation en conditions naturelles.

I-1 Position du problème

La compréhension du devenir physico-chimique d'une molécule xénobiotique modèle de faible poids moléculaire, susceptible d'être véhiculée par l'eau implique schématiquement de déterminer en quelles quantités cette molécule va se partager entre les différentes phases du sol, mais surtout de quelle manière et avec quelle vitesse elle le fera.

Ces interactions sont régies par 4 phénomènes principaux (Laudelout and Schweich 1986) :

- . La structure de l'écoulement, un écosystème est toujours ouvert et parcouru par des fluides (eau, gaz).
- . Les lois d'équilibres entre le solide et le fluide régissant la partition d'une molécule dans un système naturel et donnant accès aux quantités potentiellement adsorbables.
- . Les lois cinétiques de mise en équilibre donnant accès aux quantités réellement fixées, dépendantes des temps de séjours.
- . La nature des surfaces solides dont dépendent les lois d'équilibre, alors que leur géométrie conditionne plutôt la structure de l'écoulement et l'accessibilité des sites réactionnels donc les lois cinétiques.

Les sols étant constitués normalement de trois phases : solide (entre 60 et 40%), liquide (entre 10 et 60%) et gazeuse (entre 0 et 50%), on est amené à définir 3 interfaces possibles solide-liquide, solide-gaz et liquide-gaz. On peut même rajouter l'interface liquide-liquide, dans la mesure où l'eau du sol est divisée en une fraction d'eau mobile et une fraction d'eau immobile (eau morte, eau absorbée...) (Gaudet et al. 1977) dont les propriétés sont différentes.

Dans le cadre des études sur les pesticides, les interfaces liquide-gaz et solide-gaz doivent être prises en considérations dans le cas où l'on étudie le devenir d'une molécule volatile susceptible de se retrouver dans l'atmosphère du sol en concentration non négligeable. On pourra alors se référer en particulier à l'ouvrage de Zarzycki (1993) qui présente les bases théoriques de l'absorption des composés gazeux par les liquides ainsi que leur désorption et des exemples d'applications.

Pour le cas des molécules peu ou pas volatiles, c'est à dire ayant une tension de vapeur faible, ces concentrations peuvent être négligées d'autant plus que les teneurs en pesticides généralement rencontrées dans

la solution du sol sont faibles et au dessous de l'hydrosolubilité de la molécule (Calvet et al. 1980). Dans ce cas, la prise en compte de l'interface solide-liquide est suffisante pour approcher le comportement physico-chimique d'une molécule modèle comme par exemple le PCP.

I-2 Les processus de rétention

On sait, par de nombreuses observations que des composés chimiques de nature différente peuvent avoir des comportements différents dans un même sol. D'autre part, un même composé peut se comporter différemment dans des sols de textures ou structures différentes. Ceci nous laisse supposer que le comportement d'un produit chimique dépend de ses propriétés intrinsèques aussi bien que de la nature du milieu poreux dans lequel il se trouve.

Il existe de nombreux mécanismes de rétention des produits chimiques. De nombreux facteurs physico-chimiques sont à l'origine de l'intervention d'un processus précis ou de plusieurs en même temps, comme c'est le cas par exemple de l'atrazine (Hayes 1970) suivant les conditions naturelles.

I-2-1 Les principaux mécanismes

D'un point de vue expérimental, relativement peu de techniques permettent, à l'heure actuelle, la caractérisation des mécanismes d'interaction solide-liquide et leur quantification. On utilise essentiellement des techniques de spectroscopie à infrarouge ou Raman ou à rayons X, de mesure de la température d'adsorption par microcalorimétrie (Hayes et al. 1972), ou encore des techniques faisant appel à des protocoles particulier au cours desquels on effectue des variations de pH, de solvants d'extraction ou le découplage des interactions par l'utilisation de matrices adsorbantes variées.

L'adsorption et la désorption sont des processus dynamiques dans lesquels les molécules sont continuellement transférées entre une phase liquide et une phase solide. Les différents types de liaisons entre les molécules et les surfaces solides représentent les mécanismes impliqués

(Sposito 1984). Les forces d'attraction correspondantes sont généralement classées suivant les énergies mises en jeu et conduisent à la notion d'interactions chimiques (énergie élevée $> 42 \text{ kJ.mol}^{-1}$) et d'interactions physiques (énergie faible $< 42 \text{ kJ.mol}^{-1}$) (Calvet et al. 1980).

On peut considérer que les processus de désorption suivent les mêmes mécanismes que l'adsorption dans la mesure où ceux-ci sont réversibles. Pour le cas d'interactions comme par exemple les liaisons covalentes non réversibles on observe des phénomènes d'hystérésis (Koskinen and Harper 1990).

I-2-1-1 Les forces de London Van der Waals

Ces forces entraînent la formation de liaisons de faible énergie ($2-4 \text{ kJ.mol}^{-1}$) et sont dues essentiellement à des forces de dispersion électronique et d'interaction dipôle-dipôle ou charge-dipôle. Ces forces sont dues aux mouvements synchrones des électrons de 2 molécules adjacentes entraînant la formation d'une attraction électrostatique constante et faible. Ce mécanisme d'interaction intervient de manière importante surtout pour les macromolécules neutres ayant plusieurs sites d'interaction et où la somme de ces forces faibles peut alors entraîner des liaisons de plus forte énergie (Sposito 1984).

On attribue ce type de liaison à une majorité de solutés, bien que ce mécanisme soit particulièrement difficile à mettre en évidence du fait de la faible énergie mise en jeu (Koskinen and Harper 1990, Calvet et al. 1980).

Les composés polaires pouvant subir des interactions de type Van der Waals seront le plus souvent en compétition avec les molécules d'eau pour les sites d'adsorption.

I-2-1-2 Les liaisons hydrogène

Ces liaisons correspondent à des interactions dipôle-dipôle d'énergie supérieure aux interactions de type Van der Waals ($2 \text{ à } 60 \text{ kJ/mole}$) et sont dues aux interactions entre un atome d'hydrogène électropositif et des atomes à caractère électronégatif présentant un doublet libre, essentiellement des atomes d'oxygène et d'azote entraînant des liaisons du type $\text{-OH}\cdots\text{O-}$, $\text{-OH}\cdots\text{N-}$, $\text{-NH}\cdots\text{O-}$, $\text{-NH}\cdots\text{N-}$, (Huang 1980).

On peut donc s'attendre à ce que les xénobiotiques possédant des fonctions carboxyliques, hydroxyles, cétones ou des groupements fonctionnels azotés puissent engager des liaisons hydrogènes. Ce sera en particulier le cas des phénols (Boyd 1982) et des triazines (Hayes 1970).

I-2-1-3 Les ponts cationiques et hydriques

Cet autre mécanisme d'interaction faible est dû à la formation d'un pont entre une molécule polaire cationique ou anionique et une surface solide. Ce sont en général des ponts cationiques (effet de sel), mais il peut y avoir des ponts hydriques dans les cas où les molécules organiques sont incapables de déplacer les molécules d'eau fixées sur des cations. Le déplacement des molécules d'eau dépend directement de la taille du cation et de sa température d'hydratation (Koskinen and Harper 1990). Plus un cation aura une densité de charge élevée, plus sa température d'hydratation sera négative, et plus les molécules d'eau seront difficiles à déplacer, favorisant ainsi la formation de ponts d'eau, ce sera en particulier le cas des cations ferriques et aluminium.

Ce mécanisme intervient plus particulièrement au contact des argiles où les cations sont nombreux et hydratés (Bruckert 1979).

I-2-1-4 Interaction électrostatique en ions de charge opposée

Peu de molécules organiques naturelles sont chargées positivement aux pH rencontrés aux interfaces sols-eaux. Les interactions électrostatiques directes concernent donc principalement les relations entre anions organiques (carboxyles, hydroxyles phénoliques, sulfhydriles) et surfaces positives.

Ce mécanisme met en jeu des liaisons d'énergie plus forte que celles décrites précédemment et représente l'attraction électrostatique non spécifique d'une molécule anionique par un site de surface chargée positivement avec remplacement de l'anion présent initialement.

Ce mécanisme a été assez peu souvent observé en raison de la dominance de sites chargés négativement dans les surfaces des matrices naturelles (Huang 1990). On peut cependant le rencontrer dans les sols acides contenant une quantité significative de charges pH-dépendantes,

comme dans les sols contenant de la kaolinite ou des précipités amorphes comme des oxydes de fer ou des aluminosilicates (Sposito 1984). Ce mécanisme est pourtant très important dans les milieux carbonatés (calcaires, marnes...)

Les mécanismes d'interaction cationique peuvent être considérés comme l'inverse des interactions anioniques. Il sont cependant beaucoup plus courants à cause d'une plus grande concentration en sites d'échange cationique dû à la charge négative de la majorité des surfaces minérales et organiques.

En ce qui concerne les pesticides, ce mécanisme d'interaction est relativement rare car très peu de ces molécules sont cationiques aux pH naturels. Ces mécanismes ont été décrits dans le cas d'ammoniums quaternaires (de type diquat) et de molécules dont l'ionisation dépend du pH (bases faibles, triazines) et mettent en évidence l'importance du pH dans les processus d'interaction (Calvet et al. 1980, Koskinen and Harper 1990, Lee et al. 1990).

I-2-1-5 L'échange de ligand

Ce mécanisme provoque la formation de liaisons d'énergie supérieure aux liaisons par échange ionique. Dans les sols, il correspond le plus souvent au remplacement des fonctions hydroxyles inorganiques des molécules d'eau liées à des cations métalliques (Al, Fe) par des composés organiques portant des fonctions carboxyle ou hydroxyle. Ce mécanisme peut quasiment être assimilé à une réaction de substitution nucléophile. Il a été mis en évidence pour des composés organiques faiblement acides et des anions adsorbés sur la surface des hydroxydes (Stumm et al. 1980).

I-2-1-6 Liaison par transfert de charge

On peut distinguer deux mécanismes entraînant la formation de ce type de liaison, le premier correspond à un transfert de charge issue d'un proton de surface vers un composé organique (Sposito 1984). Ce mécanisme intervient surtout avec les composés portant des fonctions alcalines dans les sols acides, avec une faible teneur en eau et en particulier en présence de cations métalliques du type Al, Fe...

Un autre mécanisme de transfert de charges concerne le transfert d'électrons vers les molécules possédant un ou plusieurs cycles aromatiques pauvres en électrons.

Ce mécanisme a été mis en évidence par des techniques spectroscopiques montrant les variations d'absorption U.V. des cycles aromatiques comme par exemple le diquat ou le paraquat (Calvet et al. 1980), lorsqu'ils passent de l'état de soluté à l'état adsorbé. Un exemple classique est la variation de couleur du bleu de méthylène lorsqu'il passe d'une solution aqueuse à l'adsorption sur une surface argileuse.

I-2-1-7 Les liaisons de coordination

Elles s'établissent entre des atomes donneurs d'électrons comme N et O, des composés organiques et des métaux de transition (Fe, Al, Ca...), des surfaces minérales ou de la matière organique. Contrairement aux liaisons par ponts cationiques, ces liaisons de coordinations mettent en jeu des énergies très élevées. Comme pour les liaisons par transfert de charge, ces liaisons ont été mises en évidence par des techniques spectroscopiques (Calvet et al. 1980).

I-2-1-8 Les liaisons hydrophobes

Elles correspondent à des processus de partition de molécules hydrophobes entre la phase aqueuse et la phase organique des sols. Certains auteurs assimilent ces interactions à des phénomènes de solvation (Chiou et al. 1979, Briggs 1981) survenant dans tous les sols où le taux de matière organique est suffisant pour bloquer tous les autres mécanismes et en particulier ceux se déroulant au contact des argiles (Green and Karickhoff 1990).

I-2-1-9 Les liaisons covalentes

On considère généralement que la formation de ce type de liaisons intervient lorsque les molécules concernées ont été préalablement adsorbées sur les matrices solides par d'autres mécanismes. Ce type de

liaison peut conduire à la formation de résidus liés ou au piégeage des molécules dans la matrice solide et en particulier dans le réseau de polymères formé par la matière organique.

Les xénobiotiques concernés seront plus particulièrement des phénols avec la structure catéchol, des anilines et d'une manière générale tous les composés cycliques portant des fonctions réactives du type C-OH, C=O, COOH, C-NH₂, C-Cl, SO₄...

Les réactions faisant intervenir les phénols interviennent plus particulièrement avec la matière organique et sont similaires aux processus d'humification, soit par couplages oxydatifs soit par polymérisation enzymatique (Bollag et al. 1980).

I-2-2 Les paramètres physico-chimiques impliqués

Il est clair que la compréhension des processus de rétention des produits chimiques dans les sols passe par la détermination des mécanismes impliqués. Cependant, du fait du nombre élevé de mécanismes susceptibles d'intervenir séparément ou simultanément, et des difficultés pratiques pour leur identification, cette approche est le plus souvent délaissée au profit d'une représentation plus phénoménologique faisant apparaître des lois de comportement plus générales basées sur des observations expérimentales.

Ces lois de comportement correspondent généralement à des lois de partition de solutés entre des phases ayant des propriétés différentes : phase liquide-phase solide, phase aqueuse-phase organique... Dans le premier cas, on caractérise un coefficient de distribution communément appelé le K_d (cm³.g⁻¹) défini par :

$$K_d = \frac{\text{concentration en soluté dans la phase solide}}{\text{concentration en soluté dans la phase liquide}}$$

On s'est aperçu en particulier, qu'au delà d'une certaine valeur du taux de matière organique dans les sols, les mécanismes d'interactions hydrophobes devenaient prépondérants et inhibaient tous les autres mécanismes et ce, non seulement pour les composés non ioniques hydrophobes, mais aussi pour des composés ionisés portant une fonction hydrophobe (Chiou et al. 1979, Briggs 1981, Green and Karickhoff 1990).

L'étude des phénomènes de rétention a alors consisté à estimer le coefficient de partage de ces molécules hydrophobes entre l'eau et la matière organique du sol, c'est à dire le K_{oc} . Ce paramètre correspond au coefficient de partage du soluté entre l'eau et la phase organique du sol exprimée par la valeur du carbone ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ de carbone organique), il est défini par :

$$K_{oc} = \frac{\text{concentration dans le carbone organique}}{\text{concentration dans l'eau}}$$

ou encore
$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}}$$

avec f_{oc} = fraction de carbone organique (g.g^{-1}) dans la phase solide.

Ce paramètre étant directement lié aux propriétés intrinsèques des molécules, certains auteurs ont établi des relations empiriques basées sur l'équation de Collander (1950) et faisant intervenir des paramètres comme l'hydrosolubilité, la lipophilie ou la structure moléculaire (Briggs 1981, Campbell 1985, Schellenberg et al. 1984, Sabljic 1984, 1987). Ces relations permettent d'estimer rapidement le K_{oc} d'une molécule, grâce au calcul du K_d qui correspond, dans le cas d'une loi d'équilibre linéaire, à la pente de l'isotherme d'adsorption.

La validité de ces coefficients pour décrire les processus d'interaction est toutefois encore très discutée et controversée. Cependant, peu, voire aucune solution de remplacement satisfaisante n'est envisageable à l'heure actuelle. Ces coefficients sont utilisés essentiellement pour prévoir un comportement dans le sol et une potentialité d'immobilisation sans préjuger des processus impliqués.

I-2-2-1 La nature de la molécule xénobiotique

La structure chimique et en particulier les propriétés moléculaires sont très largement impliquées dans le comportement des produits organiques dans les sols puisqu'elles déterminent la nature des liaisons avec l'adsorbant.

La connaissance de ces propriétés peut donc renseigner sur les mécanismes possibles et en particulier la structure électronique des composés, les substituants qu'ils portent (leur nature et leur position), le volume moléculaire ainsi que la topologie de la molécule (Lambert 1967, Sabljic 1984, Briggs 1981).

a/ La structure électronique

La structure électronique, c'est à dire la distribution des charges électroniques dans la molécule, est un paramètre important puisqu'elle est à l'origine de la formation de liaisons charge-dipôle, dipôle-dipôle dans le cas de molécules polaires ou de liaisons covalentes ou d'échange ionique, dans le cas de molécules ionisées (comme par exemple le diquat ou le paraquat, Calvet et al. 1980).

La polarité ou la polarisabilité des composés organiques influencent directement l'aptitude à former des liaisons de coordination et des liaisons hydrogène.

b/ L'ionisation

L'aptitude des molécules à être ionisées modifie beaucoup les mécanismes intervenant dans les processus de rétention. En effet une molécule ionisée donne facilement des interactions électrostatiques anion-cation en raison des très nombreux sites ionisés présents dans la phase solide des sols.

On définit donc deux classes de molécules interagissant avec le sol suivant des mécanismes différents : les molécules ionisables, le plus souvent des acides faibles (phénols, acides carboxyliques) et des bases faibles (triazines, urées...) pouvant s'adsorber par des mécanismes ioniques (Koskinen and Harper 1990) et les molécules non ionisables, souvent hydrophobes dont les interactions pourront être assimilées à une partition entre l'eau et la matière organique du sol (Chiou et al. 1979).

Les molécules ionisables pourront également interagir avec la matière organique dans la mesure où elles présentent des fonctions hydrophobes.

c/ Les substituants

La nature des substituants portés par les squelettes moléculaires intervient au niveau du pK_a (molécules ionisables), de la solubilité et de la lipophilie de la molécule. En effet, des groupements donneurs d'électrons comme CH_3 , C_2H_5 ... ont pour effet d'augmenter le pK_a , donc de diminuer l'acidité, et de modifier la polarité de la molécule. A l'inverse, des groupements électro-attracteurs diminuent le pK_a donc modifient l'ionisation, la polarité de la molécule, et augmentent dans certains cas son hydrophobicité (halogènes) donc diminuent l'hydrosolubilité, comme dans le cas des chlorophénols (Schellenberg et al. 1984).

En plus de la nature des substituants, leur position intervient également avec essentiellement des effets stériques (encombrement et diminution de la réactivité) et des effets électroniques comme la résonance dans le cas de molécules aromatiques, le tout affectant la capacité des produits organiques à interagir avec les molécules de solvant donc leur solubilité (Koskinen and Harper 1990).

Sabljić (1984, 1987) a réussi à relier les indices de connexion moléculaires, basés sur la topologie des molécules organiques, à leur taux d'adsorption dans les sols, de manière satisfaisante, au moins pour des produits non ionisés

d/ Le volume moléculaire

Le volume moléculaire directement proportionnel à la masse molaire, comme on peut le supposer, influe beaucoup sur le comportement d'une molécule organique, d'abord sur le coefficient de diffusion, mais aussi sur la solubilité du composé (d'après la théorie de la solvation) (Briggs 1981).

Plus une molécule est volumineuse, plus sa solubilité est faible, elle a donc tendance à être "exclue" du solvant et à interagir avec les surfaces solides ou à précipiter. De plus, volume équivaut souvent à la forte multiplicité des sites d'interaction, on peut donc s'attendre à ce que les grosses molécules comme les polymères soient très facilement retenues dans les sols et qu'elles présentent peu de danger pour les nappes (Stumm 1992).

Certains auteurs ont réussi à relier le volume moléculaire représenté par le parachor (paramètre lié à la tension superficielle et au volume moléculaire) au taux de fixation ou au moins à la solubilité (Lambert 1967, Briggs 1981).

e/ L'hydrosolubilité

Dans le cas de molécules peu ou pas volatiles, les mécanismes de rétention interviennent toujours à partir d'une phase aqueuse, quelle que soit la formulation du produit. Compte tenu de leur très grande diversité chimique, les molécules xénobiotiques ont des solubilités diverses. Celles-ci varient avec la nature chimique du composé mais aussi avec le pH des solutions (molécules ionisables), leur composition saline, ou la température.

D'une façon générale, il semblerait que l'augmentation de l'hydrosolubilité entraîne la diminution de la rétention par le sol, on peut donc s'attendre à ce que tout facteur ayant un effet sur la solubilité d'un soluté ait un effet antagoniste sur sa fixation (Calvet et al. 1980, Koskinen and Harper 1990).

La solubilité peut être considérée comme la partition d'un soluté entre lui même et l'eau (Briggs 1981). Partant de cette hypothèse, on peut relier la solubilité hydrique à n'importe quel coefficient de partition par une relation empirique du type suggérée par Collander (1950) :

$$\text{Log } K_1 = a \log K_2 + b$$

où a et b sont des constantes déterminées expérimentalement et K_1 et K_2 des coefficients de partition entre deux solvants.

De nombreux auteurs ont pu établir des relations faisant intervenir la solubilité S et permettant d'estimer le coefficient de partage entre la matière organique et l'eau (Tableau I-1).

Les valeurs des constantes ont été obtenues expérimentalement avec des composés de natures différentes (Green and Karickhoff 1990). Ces relations empiriques valables pour des séries précises de composés doivent toutefois être utilisées avec précaution. En effet, il semble que chacune de

ces relations soit adaptée à une classe de composés de même famille ou de même comportement.

Cependant, Briggs (1981) a pu valider ce type de relation en se basant sur la théorie de la solvation, selon laquelle, tout soluté, pour se solubiliser doit créer un trou entre des molécules du solvant, trou dont la taille est celle du soluté et qui correspond au paramètre Parachor (lié au volume moléculaire) (Lambert 1967).

Composé	Relation
α -naphtol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$
divers composés	$\log K'_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$
composés aliphatiques	$\log K_{om} = (4,040 + /-0,038) - (0,557 + /-0,012) \log S_w$
composés aromatiques chlorés	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (mp-25)$
divers pesticides	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$
divers pesticides	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$

K'_{om} : valeurs moyennes obtenues avec différents sols ($dm^3.kg^{-1}$)

S_w : solubilité dans l'eau ($mol.l^{-1}$)

mp : température de fusion ($^{\circ}C$)

Tableau I-1 : Relations entre l'hydrosolubilité et quelques paramètres physico-chimiques (d'après Calvet 1988)

f/ La lipophilie

Au vu de la prépondérance des interactions hydrophobes dans la majorité des sols, la description des interactions en utilisant le coefficient de partage carbone organique-eau (K_{OC}), s'est généralisée (Calvet 1988).

Certains auteurs ont alors utilisé un autre paramètre, le K_{ow} , représentant le coefficient de partage d'un produit chimique entre une phase aqueuse et un solvant organique, en général le n-octanol utilisé comme modèle pour représenter la matière organique des sols (Hanch 1968, Briggs 1981, Curtis et al. 1986) :

$$K_{ow} = \frac{\text{concentration en pesticide dans l'octanol}}{\text{concentration dans l'eau}}$$

Comme pour l'hydrosolubilité, de nombreuses relations dérivées de la relation de Collander ont été établies (Tableau I-2) :

Composés	Relations
urées substituées	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log K_{ow}$
propisamide et dérivés	$K_{oc} = 0,619 + 6,69 \log K_{ow}$
α -naphtol	$\log K_{oc} = -0,317 + \log K_{ow}$
triazine, p-toluidine	$\log K_{oc} = -0,006 + 0,937 \log K_{ow}$
bromacil, diuron, chlortoluron	$\log K_{oc} = -0,40 + 1,23 \log K_{ow}$
aromatiques chlorés	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log K_{ow}$
aromatiques hydrocarbonés	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log K_{ow}$
divers pesticides	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log K_{ow}$

K_{om} : coefficient de partage eau/matière organique (cm^{-3} de matière organique)

K_{oc} : coefficient de partage eau/carbone organique (cm^{-3} de carbone organique)

K_{ow} : coefficient de partage octanol-eau

Tableau I-2 : Relations entre la lipophilie (K_{ow}) et quelques paramètres physico-chimiques (d'après Calvet 1988)

Un autre aspect important de la lipophilie des molécules organiques concerne l'effet sur le facteur de bioconcentration (BCF) qui correspond à l'accumulation des produits chimiques dans les organismes vivants.

$$BCF = \frac{\text{concentration dans un organisme vivant}}{\text{concentration dans l'eau}}$$

Cette accumulation peut être assimilée à la partition d'un soluté entre une phase aqueuse et la phase lipidique et protéique des membranes cellulaires (McCall et al. 1983, Geyer et al. 1980, 1984), et ainsi être reliée à d'autres coefficients de partage, tableau I-3 :

Relations prédites	Relations déterminées par Kenaga & Goring (1979)
$\log K_{oc} = 0,52 \log K_{ow} + 0,65$	$\log K_{oc} = 0,544 \log K_{ow} + 1,377$
$\log K_{oc} = 3,1 - 0,52 \log WS$	$\log K_{oc} = 3,64 - 0,55 \log WS$
$\log BCF = 0,68 \log K_{ow} - 0,4$	$\log BCF_f = 0,935 \log K_{ow} - 1,495$
	$\log BCF_t = 0,767 \log K_{ow} - 0,973$
$\log BCF = 1,25 \log K_{oc} - 1,22$	$\log BCF_f = 1,119 \log K_{oc} - 1,579$
	$\log BCF_t = 1,225 \log K_{oc} - 2,024$
$\log BCF = 3,04 - 0,68 \log WS$	$\log BCF_f = 2,791 - 0,564 \log WS$
	$\log BCF_t = 2,183 - 0,629 \log WS$

BCF_f = systèmes aquatiques en écoulement

BCF_t = systèmes terrestres et aquatiques

Tableau I-3 : Relations entre le facteur de bioaccumulation (BCF) et quelques paramètres physico-chimiques (d'après Calvet 1988)

Le degré de lipophilie des molécules organiques semble donc être un renseignement primordial quant à leur comportement au contact de surfaces minérales ou organiques. Ceci se traduit généralement par une excellente corrélation entre l'estimation du K_{ow} et la rétention dans les sols (Curtis et al. 1986), et confirme l'hypothèse de la prédominance d'interactions hydrophobes dans les sols, pour la majorité des molécules xénobiotiques partiellement ou totalement hydrophobes (Chiou et al. 1979).

I-2-2-2 La nature de la solution du sol

Nous ne nous intéressons pas ici à la nature et aux caractéristiques de la solution du sol qui sont déjà décrites dans de nombreux ouvrages de base (Hillel 1980, Musy & Soutter 1991, Sposito 1989, Sigg et al. 1992) mais seulement aux effets possibles de ses modifications sur les processus de rétention.

D'une façon générale, on peut dire que la nature de la solution du sol influera essentiellement sur l'hydrosolubilité des produits chimiques introduits dans les sols.

a/ Sa composition

La composition de la solution du sol a un effet sur les processus de rétention soit par des variations de force ionique (aspect quantitatif), soit par la présence de composés particuliers (aspect qualitatif) (Calvet et al. 1980).

De nombreux auteurs ont montré qu'une augmentation de la force ionique pouvait avoir des effets différents suivant la nature du produit chimique étudié. Des molécules neutres ou faiblement basiques comme les triazines (Green & Karickhoff 1990) voient leur solubilité diminuer alors que la solubilité des molécules faiblement acides augmente grâce à l'effet de sel, c'est le cas par exemple du Picloram (Calvet et al. 1980) ou du PCP (Alary et al 1992, Galvez 1990). Ces effets sont généralement expliqués par des variations de forces électrostatiques au sein de la solution (Sposito 1989).

Cependant, lorsque la force ionique est élevée, l'effet sur la solubilité est généralement négatif, provoquant un processus d'exclusion de la phase aqueuse ou de précipitation et favorisant les interactions avec les surfaces.

En dehors des effets dus à la force ionique, la composition ionique de la solution du sol peut influencer directement le comportement des pesticides. C'est le cas en particulier des cations comme Fe, Al, Ca, Mg, K qui peuvent dans certains cas provoquer la formation de sels. Le pesticide se comporte alors comme la molécule neutre (Westall 1985). Dans la majorité des cas, la présence de cations entraîne une diminution des concentrations en solution (Calvet et al. 1980) soit par une coprécipitation soit par adsorption du soluté sur des oxydes métalliques (Belkessam 1993), et en particulier de fer et d'aluminium.

La présence de composés organiques dissous dans la solution du sol semble avoir un effet prépondérant sur le comportement de certains pesticides (Barriuso et al. 1992, Fabre 1990, Curtis et al. 1986, Nkedi-Kizza et al. 1985).

Certains auteurs ont constaté une augmentation de la solubilité de ces pesticides limitant ainsi les interactions avec les matrices solides du fait d'une plus grande compétition des différents solutés présents pour les sites d'interaction (Lee et al. 1991).

Il a également été constaté que la présence de cette matière organique dissoute ou même colloïdale, qui présente approximativement les mêmes caractéristiques que les acides humiques et fulviques (Koskinen

1990), provoque des interactions de type hydrophobe (partage entre 2 solvants) conduisant au transfert des pesticides sous forme fixée et rendant ainsi ces produits potentiellement plus dangereux (Sposito 1989, Barriuso et al. 1992).

Dans de nombreux cas, (Atrazine, PCP, lindane) (Fabre 1990) la présence d'acides humiques ou fulviques dissous provoque une augmentation très nette de la fixation, conduisant même à une rétention totale.

b/ Sa température

La température de la solution du sol a généralement pour effet d'augmenter la solubilité des pesticides par une augmentation de l'activité des molécules de solvant. Comme nous l'avons vu précédemment, une augmentation de solubilité entraîne en général la diminution des interactions avec les surfaces. Cependant dans certains cas, une augmentation de plusieurs dizaines de degrés celsius peut n'avoir aucun effet sur l'adsorption, c'est le cas par exemple du parathion (Calvet et al. 1980) ou même entraîner une augmentation des interactions, la température entraînant aussi l'augmentation de l'affinité des acides humiques ou des argiles pour certains composés comme l'atrazine ou le bromacil (Calvet et al. 1980).

Il est donc difficile d'établir des règles satisfaisantes quant à l'effet de la température à cause du nombre important de modifications intervenant dans un système terrestre, sans compter l'effet de la température sur les activités biologiques influant elles aussi sur la composition de la solution du sol.

c/ Son pH

Le pH de la solution du sol est un des principaux paramètres gouvernant les interactions solide-liquide des molécules ionisées en faisant varier leur solubilité mais aussi des molécules non ionisées en modifiant les charges des surfaces minérales ou organiques et déterminant ainsi le mécanisme d'interaction prépondérant (Sposito 1989).

Les effets du pH sur les processus de rétention sont souvent complexes et peuvent être directs ou indirects. On peut observer un effet direct d'une modification de pH dans le cas de molécules ionisées, acides

ou basiques, entraînant des changements de concentrations entre les formes neutres et les formes ionisées en fonction du pKa. En général, l'affinité pour l'eau des molécules ionisées est plus forte que celle des molécules neutres, une variation de pH aura donc un effet inverse sur la solubilité d'une molécule basique et d'une molécule acide (Calvet et al. 1980, Koskinen & Harper 1990).

A l'inverse, les molécules neutres ont une plus grande affinité pour les matrices solides et surtout pour la matière organique, elles seront donc retenues d'une façon plus permanente et en tout cas indépendante des variations de pH dans les sols.

Ces propriétés sont d'ailleurs utilisées pour l'identification des mécanismes d'interaction (Lee et al. 1990, Adamson 1990) en suivant l'évolution du K_d ou du K_{oc} en fonction du pH.

D'autre part, le pH peut avoir un effet indirect sur les processus de rétention par l'intermédiaire d'une modification de la composition de la solution du sol. En effet, une augmentation de pH peut entraîner la solubilisation de matière organique augmentant ainsi l'hydrosolubilité des composés hydrophobes (Barriuso et al. 1992, Curtis et al. 1986, Nkedi-Kizza et al. 1985, Fabre 1990). Une diminution de pH peut, quant à elle, augmenter la concentration en sels solubles de la solution, entraînant ainsi une modification de la force ionique de la solution et pouvant induire les conséquences décrites précédemment.

On peut également observer un effet indirect par la modification de la matrice minérale, et en particulier lors d'une baisse de pH entraînant des variations de charge et de structure chimique du réseau humique mais surtout l'hydrolyse de la surface du réseau cristallin des argiles avec l'apparition d'ions Al^{3+} et Fe^{3+} formant alors des hydroxydes très réactifs (Koskinen & Harper 1990).

Ces effets de pH sont en grande partie à l'origine des différences de comportements, notamment des molécules ionisables, observées dans des sols différents (Lee et al. 1990).

Certaines règles ont été adoptées concernant l'effet du pH, en se basant en particulier sur le fait que dans un sol, le pH des surfaces minérales est environ inférieur de 2 unités au pH mesuré dans l'eau du sol (Green & Karickhoff 1990). Il apparaît que pour les molécules ionisables, le pH a peu d'effet sur le K_d si $pH - 3 > pKa$ (Green & Karickhoff 1990).

d/ La teneur en eau

La grande majorité des mesures d'adsorption sont faites sur des suspensions très diluées, qui représentent des conditions très éloignées de la réalité en ce qui concerne les proportions eau-sol. Ces proportions régulent naturellement dans les sols l'état d'agrégation, l'acidité des surfaces et leur accessibilité, le potentiel redox et l'aération. Tous ces paramètres peuvent influencer quantitativement et qualitativement les processus de rétention.

D'une manière générale, cependant, on peut dire que le fait de mesurer la fixation des pesticides dans des suspensions de sols diluées conduit à une surestimation de la fixation due au fait que la totalité des sites de fixation sont disponibles alors que dans un sol naturel c'est rarement le cas. Les agrégats naturels sont différents et la diffusion dans la microporosité est un facteur limitant.

Ces techniques permettent néanmoins d'avoir accès aux capacités maximales d'adsorption dans des conditions d'équilibre, ce qui permet d'avoir une base de comparaison des différents xénobiotiques.

I-2-2-3 La nature de la matrice solide

La nature des matériaux adsorbants du sol contribue également à fixer la nature des liaisons donc des mécanismes d'interactions.

I-2-2-3-1 Les constituants minéraux

a/ Les argiles

Les argiles sont des aluminosilicates plus ou moins altérés, dont les principales caractéristiques résident dans leur grande surface spécifique, leur conférant de fortes capacités d'échange cationique, et dans leur propriétés colloïdales (Sposito 1989).

Les argiles les plus étudiées (car les plus répandues) sont la kaolinite, la montmorillonite et l'illite dont les caractéristiques de surface et d'échange ionique sont différentes. Elles ont donc des interactions différentes avec les composés organiques.

En plus des surfaces spécifiques de chaque type d'argile, la nature de l'ion compensateur est également important car ces ions ayant des propriétés différentes comme par exemple la température d'hydratation (Koskinen & Harper 1990), ils réagiront différemment avec les composés organiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, ces ions peuvent être des sites d'adsorption privilégiés pour les pesticides (liaisons cation-dipôle), ils peuvent également entrer en compétition pour des sites d'interactions (diminution de l'adsorption), et ils peuvent former des complexes argiles-hydroxydes très réactifs (en particulier avec le fer et l'aluminium).

b/ Les oxydes et les hydroxydes cristallins

On compte parmi ceux ci les oxydes de silicium parmi lesquels le quartz et la cristobalite qui ont en général des capacités d'adsorption très faibles voire nulles (Lee et al. 1990), contrairement aux oxydes et hydroxydes métalliques qui eux peuvent présenter des propriétés d'adsorption non négligeables, en particulier dans le cas des acides faibles comme les phénols (Mc Bride & Kung 1991).

c/ Les oxydes et les hydroxydes amorphes

Ces minéraux sont souvent associés à des oxydes ou hydroxydes cristallisés ou enrobés autour des argiles, et proviennent le plus souvent de leur altération (oxydes d'aluminium) (Sposito, 1989).

Les oxydes et les hydroxydes de fer sont des minéraux secondaires au même titre que les argiles et se déposent principalement sur les kaolinites. Il existe des illites ou des montmorillonites ferrifères, mais alors le Fe est dans les octaèdres et non à l'état de revêtement sur les surfaces.

Les oxydes et les hydroxydes de fer et d'aluminium jouent un rôle très important dans la fixation des pesticides ionisés ou pouvant engager des liaisons hydrogènes car ils sont très riches en groupement -OH.

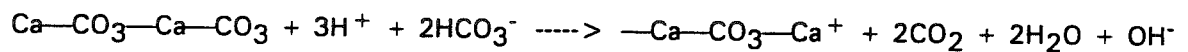
En outre, ils peuvent présenter des charges positives par l'intermédiaire de groupements $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ou $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ augmentant la capacité d'échange anionique des sols.

d/ Les carbonates

Dans la plupart des sols dont le pH est supérieur à 7, le carbonate de calcium se manifeste sous des formes granulométriques très variables.

La surface des particules de CaCO_3 (ou de Ca , MgCO_3) est en constant équilibre avec le CO_2 dissout dans la solution du sol, CO_2 qui est renouvelé soit à partir du réservoir atmosphérique général, soit à partir des processus respiratoires des organismes vivants dans le sol (racines, bactéries...).

Les surfaces des particules de CaCO_3 présentent généralement plus de sites cationiques ($-\text{Ca}^+$) que de sites anioniques ($-\text{CO}_3^-$) en raison du mécanisme même de l'altération par les eaux chargées de CO_2 (pH 5,5 environ) qui provoque la formation de CO_2 à partir de l'anion $-\text{CO}_3^-$:



L'adsorption d'anions organiques (acides aliphatiques, acides fulviques) ou inorganique (en particulier les groupements phosphatés) a été montrée sur différentes matrices carbonatées.

Comme il s'agit d'une interaction ionique, les possibilités de désorption des composés organiques par des variations locales du pH ou par la destruction de la surface du carbonate sont importantes (sauf en ce qui concerne les groupements phosphatés). Mais le piégeage par une surface voisine reste une hypothèse très vraisemblable, étant donné le faible taux de transfert organique observé dans les sols calcaires.

I-2-2-3-2 Les constituants organiques

Dans les couches de surface de l'écorce terrestre constituant les sols, on trouve de la matière organique vivante ou non. Parmi les composés de la matière organique non vivante, on distingue les composés humiques et les composés non humiques.

Ces derniers sont constitués de débris végétaux en voie de décomposition et comprennent des produits connus comme des protéines, des sucres, des acides aminés...

Les composés humiques, issus de l'humification des composés précédents ont des structures chimiques variables et mal connues. On distingue les acides fulviques, les acides humiques et l'humine, mais ils possèdent tous les mêmes groupements fonctionnels (COOH , OH , NH_2 ...) extrêmement réactifs (Fabre 1990, Flaig et al. 1975).

Comme les argiles, les composés humiques possèdent des propriétés colloïdales, avec des surfaces spécifiques et des capacités d'échange cationique souvent très importantes (Sposito 1989, Musy & Soutter 1991).

La multitude des groupements fonctionnels, la variété des sites hydrophobes et hydrophiles et les propriétés colloïdales font que les composés organiques sont considérés comme les sites d'interaction prépondérants pour la majorité des intrants organiques (Chiou et al. 1979, Calvet et al. 1980, Briggs 1981, Lee et al. 1990).

Certains auteurs estiment même qu'au delà de 2% de matière organique dans un sol, les interactions avec les autres constituants pourront être négligées (Karickhoff 1984, Green & Karickhoff 1990).

I-2-2-3-3 La structure du sol

Tout comme la texture, la structuration d'un sol influe directement sur le comportement des pesticides essentiellement à cause de la distribution de la porosité du sol en micro et macro-porosité.

Cette distribution est issue de l'aggrégation des particules solides par l'intermédiaire de liants (argiles et humus) et dépend de la distribution granulométrique de ces particules solides.

La distribution de la porosité influe directement sur le comportement physique du sol et en particulier sur les processus de transfert donc sur les interactions avec les produits chimiques en faisant apparaître des cinétiques de diffusion dans la microporosité.

Cette diffusion limite voire empêche les interactions solide-liquide (figure I-1) suivant les temps caractéristiques de transfert.

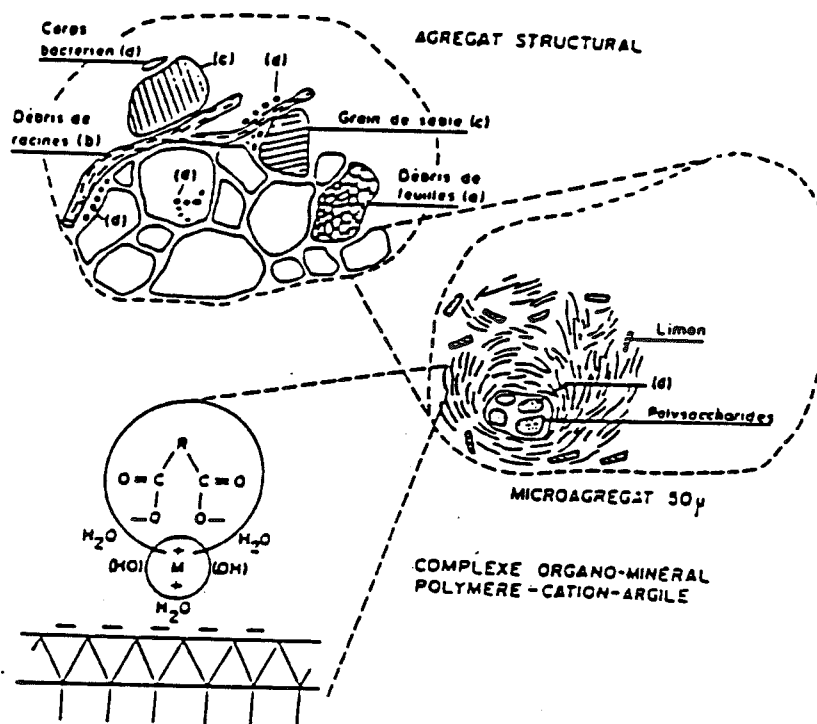


Figure I-1 : Structuration des sols : formation des agrégats et structure des complexes organo-minéraux (d'après Bruckert, 1979)

I-3 Estimation et représentation de la fixation

Les processus de rétention des produits organiques dans les sols font intervenir de nombreux mécanismes qui peuvent survenir séparément ou simultanément rendant ce type d'étude très complexe.

De plus aucune représentation correcte ne pourra être obtenue sans la compréhension des facteurs décrits précédemment.

Dans la multitude de paramètres influant sur les interactions de ce type de produits avec les matrices solides, certains sont plus importants que d'autres, c'est le cas par exemple du taux de matière organique et d'argile du sol, ainsi que des propriétés moléculaires des composés organiques.

Sur ces bases, certains auteurs ont proposé des schémas permettant d'accéder de manière rapide aux coefficients de partage des molécules

xénobiotiques donnant ainsi une idée de leur comportement potentiel (Briggs 1981, Green & Karickhoff 1990) (Annexe 1).

Les processus de rétention impliquent de nombreux mécanismes d'interaction liés à la molécule elle-même, au sol et à la solution du sol.

Une représentation des équilibres est souvent donnée par des relations mathématiques empiriques simples du type Freundlich ou Langmuir.

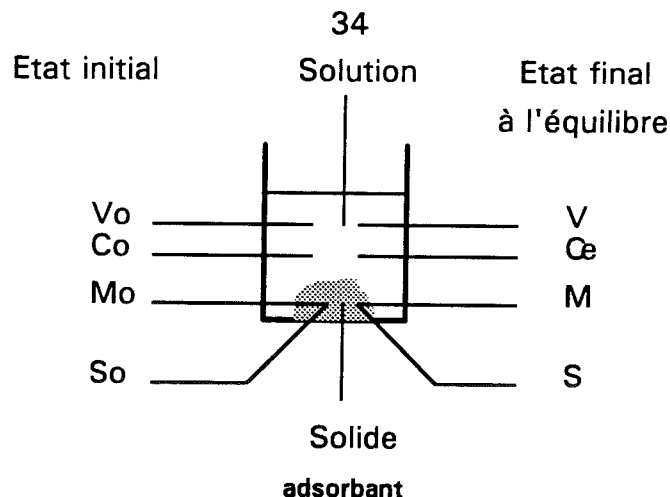
Cependant, compte tenu de la structuration complexe de la phase solide des sols, avec une macroporosité où s'effectuent les transferts hydriques et une microporosité beaucoup moins accessible (figure I-1), il est nécessaire de déterminer les lois cinétiques régissant les temps d'accès et de contact des solutés avec les surfaces solides.

La prise en compte des phénomènes dynamiques observés en présence d'un écoulement est nécessaire puisqu'ils sont toujours présents dans les phénomènes naturels.

Une démarche en plusieurs étapes semble donc incontournable : tout d'abord, il est nécessaire d'établir une formulation claire permettant de décrire les processus d'interaction à l'équilibre puis d'établir des relations prenant en compte les différentes cinétiques impliquées (Sardin et al. 1991), avant d'introduire les paramètres correspondants dans un modèle de transfert d'eau et de soluté en milieu poreux (Chap. V).

I-3-1 Etude de l'équilibre

L'étude des processus de fixation en conditions d'équilibre s'effectue généralement dans des réacteurs fermés (batch) (figure I-2) dans lesquels on met en contact pendant un temps suffisamment long pour atteindre l'équilibre, une quantité connue de soluté en solution avec une quantité connue d'adsorbant.



$V_o = V =$ Volume de la solution (cm^3)

$M_o = M =$ Masse de sol (g)

$C_o =$ Concentration en soluté dans la solution à T_o ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

$C_e =$ Concentration en soluté dans la solution à l'équilibre ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

$S_o =$ Concentration en soluté dans la phase solide à T_o ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

$S =$ Concentration en soluté dans la phase solide à l'équilibre ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Figure I-2 : Schéma d'un réacteur fermé utilisé pour l'obtention des courbes de fixation à l'équilibre

En considérant M et V constants, on peut écrire le bilan de conservation du soluté :

$$VC_o + S_oM = VC_e + SM \quad (\text{I-1})$$

En faisant varier les concentrations des solutés tout en gardant constants le volume du système et la masse d'adsorbant, on obtient une courbe de fixation du soluté : $S = f(C_e)$

Cette courbe est souvent assimilée abusivement à une isotherme d'adsorption permettant d'extraire directement la ou les lois d'équilibre thermodynamique. Ceci ne sera vrai que dans le cas d'un équilibre indépendant où la loi de fixation ne dépend que de la concentration en soluté. C'est rarement le cas comme nous avons pu le voir précédemment, sauf dans le cas de concentrations extrêmement faibles. C'est néanmoins le cas pour les pesticides rencontrés dans l'environnement.

Dans la plupart des cas, ces courbes de fixation seront affectées par le protocole expérimental suivi. Il faut alors s'en affranchir avant d'extraire les lois d'équilibre (Schweich 1986).

En ce qui concerne les pesticides, il est souvent possible de valider l'hypothèse de l'équilibre indépendant des conditions expérimentales.

En considérant que les mécanismes de fixation sont réversibles, on peut définir une réaction d'interaction :



ou C_e représente la concentration en xénobiotique dans la solution et S la concentration dans la phase solide, le tout étant à l'équilibre.

On définit ainsi une "constante" d'équilibre K_d :

$$K_d = \frac{S}{C_e} \quad (I-3)$$

correspondant au coefficient de partage du xénobiotique entre les deux phases. K n'est une constante que si S dépend linéairement de C_e .

A l'équilibre, la variation d'énergie libre ΔG du système est nulle, autrement dit l'activité chimique des xénobiotiques est la même dans la phase solide et dans la phase liquide :

$$a_i = \bar{a}_i \quad (I-4)$$

a_i étant l'activité d'un soluté i en solution et \bar{a}_i son activité dans la phase solide.

On introduit alors un coefficient d'activité γ pour expliquer le fait que des solutés différents ne se partagent pas de la même manière entre les deux phases (Biggar & Cheng 1973) :

$$a_i = \gamma_i C \quad (I-5)$$

on obtient alors la loi générale :

$$C_e \gamma_e = S \gamma_s \quad (I-6)$$

conduisant à la définition du coefficient de partage :

$$K = \frac{\gamma_e}{\gamma_s} \quad (I-7)$$

Il existe rarement une fonction linéaire entre les deux grandeurs C et S. La relation empirique de Freundlich est alors fréquemment utilisée pour décrire les isothermes d'adsorption non linéaires :

$$S = K C_e^N \quad (I-8)$$

où N et K sont des constantes d'ajustement. Cette équation est également utilisée sous sa forme linéarisée :

$$\text{Log} S = \text{Log} K + N \text{Log} C_e \quad (I-9)$$

Le Kd peut alors être calculé selon l'équation :

$$K_d = \frac{S}{C_e} = \frac{K C_e^N}{C_e} = K C_e^{N-1} \quad (I-10)$$

Le modèle de Langmuir, qui prend en compte la désorption, est également utilisé pour représenter certains résultats expérimentaux dans le cas de relations non linéaires :

$$S = \frac{\alpha C_e}{1 + K C_e} \quad (I-11)$$

où α et K sont des coefficients constants.

Le coefficient de distribution est alors égal à :

$$K_d = \frac{S}{C_e} = \frac{\alpha}{1 + K C_e} \approx \alpha \quad (I-12)$$

si la concentration est très faible (pesticides).

Le modèle de Langmuir qui a été développé pour l'adsorption des gaz, repose sur trois hypothèses :

l'énergie d'adsorption est constante et indépendante de la surface couverte, l'adsorption se fait sur des sites localisés, le maximum d'adsorption possible se produit en monocouches.

Dans le cas de milieux liquides, ces hypothèses sont très discutables, cependant pour des solutions diluées, ce modèle reste valide.

Pour les molécules organiques hydrophobes, la fixation est assimilée à des interactions avec la matière organique, le K_d est alors proportionnel à K_{oc} :

$$K_d = K_{oc} f_{oc} \quad (I-13)$$

ou f_{oc} représente la teneur en carbone organique du sol et K_{oc} le coefficient de partage de la molécule entre le carbone organique du sol et l'eau (Chiou et al. 1979, Green & Karickhoff 1990).

I-3-2 Les cinétiques de transfert de matière entre phases

Les lois d'équilibre qui viennent d'être décrites permettent de caractériser l'état du système liquide-solide à l'équilibre. Ces lois ne permettent généralement pas de décrire le passage d'un état initial à un état d'équilibre. Il faut alors faire appel à la cinétique qui décrit les étapes permettant d'atteindre l'équilibre thermodynamique (Villermaux 1981).

Comme nous avons pu le voir (figure I-1), le sol est un système hétérogène complexe et structuré. Cette structuration fait apparaître la notion de compartiments interne et externe aux agrégats. Cette compartimentation est à l'origine des phénomènes diffusionnels rencontrés, notamment lors des transferts de masse dits internes (figure I-3).

Ce schéma montre en particulier qu'une molécule xénobiotique, avant d'interagir avec la matrice solide, doit traverser la couche de liquide immobile (couche limite δ) puis pénétrer à l'intérieur des microagrégats, le tout par diffusion moléculaire.

On explique ainsi le décalage qu'il peut y avoir entre le comportement d'un soluté dans un sol naturel et celui prédit par une loi d'équilibre obtenue en réacteur fermé (Sardin 1986).

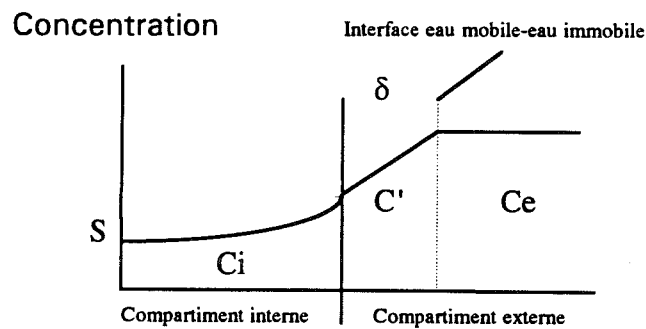
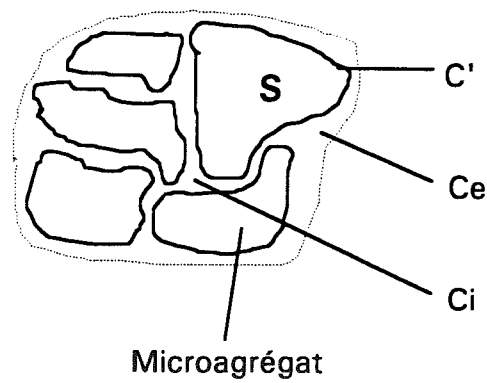


Figure I-3 : Schéma d'un agrégat structural et représentation d'un profil possible de concentration en soluté dans les différentes phases (d'après Laudelout & Schweich 1986)

Il faut noter ici que dans le cas de grains solides non poreux (sables) le transfert interne n'est pas pris en compte, on considère alors seulement les cinétiques de transfert externe et d'interaction proprement dite.

Pour modéliser les phénomènes cinétiques, on utilise généralement une loi cinétique du premier ordre (Van Genuchten 1976, Cameron & Klute 1977, Novy-Quadri 1993) :

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{1}{T_M} (K C_e - S) \quad (I-14)$$

où T_M est le temps caractéristique du transfert de matière. T_M peut être décomposé en trois éléments :

$$T_M = t_a + t_e + t_i$$

t_a est le temps caractéristique du mécanisme de fixation, t_i le temps caractéristique du transfert interne et t_e celui du transfert externe.

En règle générale, T_M est assimilé au temps caractéristique du processus limitant (temps le plus grand) les autres étapes sont alors considérées à l'équilibre (figure I-4).

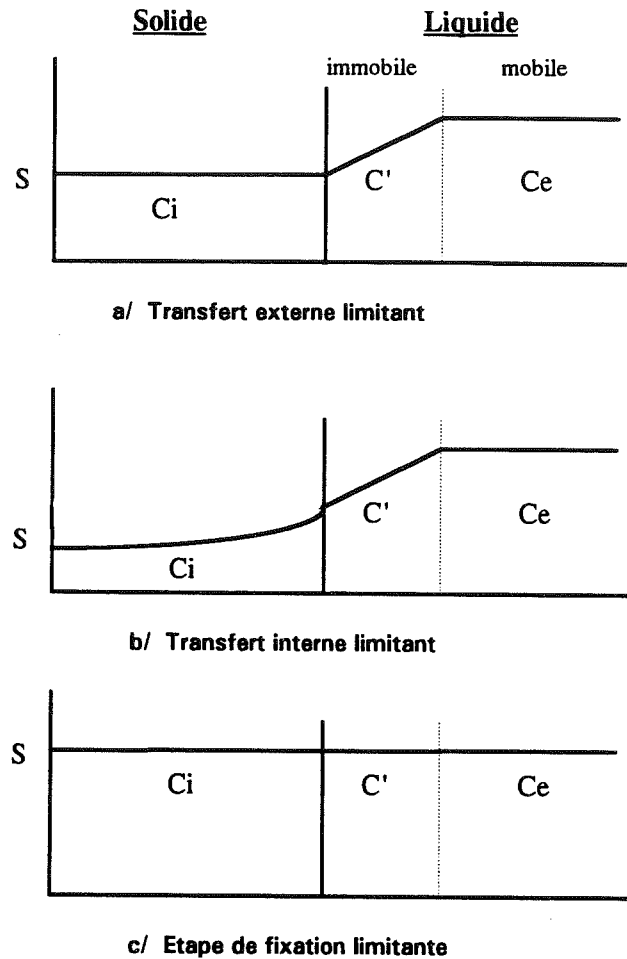


Figure I-4 : Variation des concentrations dans un agrégat en fonction de l'étape limitante de la diffusion (d'après Sardin 1991)

Il est rarement possible de calculer ces différents temps caractéristiques. On est alors obligé de les déterminer expérimentalement en faisant varier les conditions opératoires, ce qui permet d'identifier l'étape limitante (Novy-Quadri 1993, Schweich 1986).

I-3-3 Effet de la présence d'un écoulement

Tout système naturel est parcouru par des fluides et la structure de l'écoulement influence directement le comportement physico-chimique des molécules polluantes.

La prédiction des transferts devra donc prendre en compte l'effet du transport hydrique sur les processus d'interaction. Ce sera la troisième étape de ces études. L'expérimentation en colonne est devenue incontournable pour l'étude et la quantification de ces processus (Gaudet et al. 1977, Van Genuchten et al 1976) puisqu'elle permet de prendre en compte la dimension nouvelle apportée par le déplacement relatif du fluide transportant le soluté par rapport au solide stationnaire. Il y a évidemment un couplage entre l'écoulement de l'eau et le transport de soluté.

L'approche de la dynamique des systèmes sur colonnes permet d'appréhender ces phénomènes d'une manière plus représentative que l'approche en réacteurs fermés mais elle ne sera performante que dans la mesure où l'on pourra (par le choix des conditions d'essais) faire le découplage entre ce qui est dû à l'hydrodynamique et ce qui est dû aux interactions physico-chimiques.

Ceci sera décrit ultérieurement au chapitre V.

CONCLUSION

Les objectifs de ce chapitre étaient de décrire les principaux mécanismes d'interaction solide-liquide, ainsi que les différents facteurs abiotiques pouvant les affecter, afin de préciser la meilleure représentation possible de ce processus.

Nous avons pu voir qu'il existe un très grand nombre de mécanismes d'interaction, ce qui ne permet pas d'envisager une approche déterministe pour représenter de manière simple les processus d'interaction solide-liquide. Une approche phénoménologique est alors nécessaire, qui permet de proposer des descriptions macroscopiques du comportement des pesticides dans les sols et qui ont l'avantage de pouvoir être représentées par des lois mathématiques simples.

Ces relations font généralement intervenir des paramètres empiriques très commodes d'utilisation comme le K_d , le K_{ow} ou encore le K_{oc} mais ne permettent pas une représentation correcte de la réalité. En particulier, les phénomènes cinétiques induits par la structuration des sols et par le fractionnement de l'eau ne sont pas pris en compte par ces relations.

Ceux-ci pourraient expliquer par exemple pourquoi certains produits comme l'atrazine, qui devrait, au vu des coefficients de partage déterminés à l'équilibre, être fortement retenue dans les sols, se retrouve en réalité assez vite dans les nappes phréatiques.

Les lois de comportement à l'équilibre doivent donc être complétées par l'étude des différentes cinétiques impliquées et en particulier la cinétique de transfert de matière entre l'eau mobile et l'eau immobile qui est souvent l'étape limitante de la fixation.

La prise en compte des phénomènes cinétiques n'est cependant pas non plus suffisante pour fournir une représentation correcte du comportement physico-chimique des pesticides dans les sols. En effet, ceux-ci étant des systèmes dynamiques, la prise en compte de la circulation de l'eau et des gaz, ainsi que tous les effets liés à la teneur en eau sont incontournables.

Par ailleurs, la transposition au terrain des lois déterminées à l'échelle macroscopique nécessite la prise en compte de la variabilité spatiale et structurale des sols (en particulier la fissuration, qui conduit à des écoulements préférentiels) ainsi que des facteurs pédoclimatiques tels que les fortes précipitations, les sécheresses pouvant avoir des effets sur la composition et la réactivité de la solution du sol.

CHAPITRE II

**LES SOLS ET LA MOLECULE ORGANIQUE : CHOIX PRATIQUES
ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES**

INTRODUCTION

Comme pour les études de terrain, les études en laboratoire du comportement des produits chimiques dans les sols, nécessitent la plupart du temps, d'effectuer des compromis permettant d'ajuster notamment la durée des expérimentations à la durée des études.

Dans notre cas, nous avons été amenés à choisir en particulier des sols ne présentant pas des interactions avec le pesticide modèle susceptibles de conduire à des essais trop longs de transfert en colonnes de sols. Pour cela, comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre, la teneur en matière organique ainsi que le pH du sol doivent être des critères pour le choix du sol utilisé comme modèle pour l'étude en système dynamique.

Par ailleurs, le choix d'une molécule organique xénobiotique doit être effectué en fonction d'un certain intérêt scientifique fondamental en plus de l'intérêt économique évident.

Nous nous proposons donc dans ce chapitre de présenter l'intérêt des sols et de la molécule modèle choisis ainsi que leurs principales caractéristiques physico-chimiques.

De plus, nous étudierons les interactions présentées par la molécule modèle avec différentes matrices solides afin de déterminer les principaux mécanismes impliqués.

Nous nous intéresserons également aux facteurs susceptibles d'influencer ces interactions (pH, force ionique...) ainsi que les aspects cinétiques de la fixation : adsorption et désorption, comme cela a été décrit dans le chapitre I.

II-1 Choix de la molécule organique et des sols

II-1-1 Les sols modèles

L'objet de cette étude concerne pour partie la mise au point d'une méthodologie d'étude du comportement des produits chimiques en colonnes. L'utilisation de sols naturels à forte teneur en matière organique n'était pas envisageable pour cette mise au point méthodologique, compte tenu de la durée des essais de transfert de xénobiotiques interactifs.

Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser, dans un premier temps, un sable, comme support. Ce qui a permis de réduire considérablement les temps de mise au point en condition de saturation en eau mais surtout en condition d'insaturation. L'utilisation d'un sable a permis d'autre part de découpler les études. En effet, le sable étant très faiblement interactif avec les xénobiotiques, on a pu étudier d'abord les aspects hydrodynamiques puis les interactions physico-chimiques, en l'absence de matière organique. Ensuite des sols contenant de la matière organique ont été utilisés.

II-1-1-1 Le sable

Dans le cadre de cette étude, on a choisi du sable de Fontainebleau commercialisé par Prolabo. Ce sable possède une granulométrie relativement serrée et comprise entre 150 et 210 μm . C'est un sable constitué quasiment à 100% de silice, sans matière organique, mais avec quelques impuretés métalliques. L'analyse élémentaire de ce sable a révélé la présence de 70 mg/kg de fer et 340 mg/kg d'aluminium. Une analyse réfractométrique aux rayons X a révélé que la silice était entièrement cristalline, aucune forme amorphe n'ayant pu être mise en évidence (Novy-Quadri 1993).

Le mode opératoire de mise en place du sable dans les colonnes est décrit dans l'annexe 2. Ce procédé permet d'obtenir des profils de densité sèche constants tout au long des colonnes. Pour ce sable on obtient en moyenne une densité sèche en place de $1,75 \pm 0,02 \text{ g.cm}^{-3}$. L'homogénéité du profil de densité sèche est contrôlée par gammamétrie (cf. V-B-2) (figure V-5).

II-1-1-2 Le sol brun lessivé sous prairie

Nous avons choisi d'utiliser, pour les études microbiologiques, un sol couramment employé dans le Laboratoire de Microbiologie des Sols de Lyon : un sol brun lessivé, prélevé sous prairie permanente de légumineuses et graminées fourragères dans la région lyonnaise. Situé dans une zone d'épandage fluvio-glaciaire, il est assez représentatif des Piémonts alpins et des zones ayant subi des influences glaciaires.

Ce sol a déjà fait l'objet de nombreux travaux (Crozat et Cleyet-Marel 1984, Richaume 1992, Recorbet 1993), qui ont montré qu'il ne présentait pas de caractéristiques physico-chimiques extrêmes. Les principales caractéristiques du sol tamisé à 2 mm sont reportées dans le tableau I-1.

Ce sol contient une abondante biomasse microbienne. En effet, 1265 μ g de carbone par gramme de sol sec sont attribuables aux microorganismes. Une étude sur la distribution de cette biomasse dans les différentes fractions minérales a par ailleurs été effectuée, (Guez, 1990). Les résultats correspondants sont présentés dans les tableaux II-1 et II-2 :

Argiles	31,4%	Carbone organique = 6%		
Limons	35,4%	(correspond à environ 10% de		
Sables	32,2%	matière organique).		
		Rapport C/N = 10/1		
		pH eau = 6,25		
Humidité équivalente à la capacité au champ = 40%				
<u>Potentiel de rétention de l'eau :</u>				
pF	2,5	3	3,5	4,2
Humidité (%)	42	39	37	32
pondérale				

Tableau II-1 : Principales caractéristiques du sol brun lessivé sous prairie

Fractions(μm)	< 2	2-20	20-50	50-250	> 250	Total
Minéraux % du total	5	30	21	33	11	-
Biomasse microbienne % du total	22	38	8	24	9	1265 $\mu\text{g C.g}^{-1}$

Tableau II-2 : Distribution de la biomasse microbienne dans les fractions minérales du sol brun lessivé sous prairie

Une partie des études microbiologiques effectuées au cours de ce travail imposait d'utiliser des sols sans activité microbienne naturelle. Nous avons alors été confrontés au problème du mode de stérilisation de ces sols.

L'influence du mode de stérilisation (autoclavage ou rayons gamma) a été étudiée pour ce sol par Steinberg (1987). Il a montré en particulier que la stérilisation par rayons gamma à une dose minimum de 25kGrays par exposition à 1 source de Cobalt 60 (Conservatome, Dagneux, France) était la moins perturbante du point de vue physique ou chimique.

Cette technique nécessite en revanche un délai d'immobilisation de 8 semaines après irradiation afin que les activités enzymatiques soient totalement inhibées. Nous avons retenu ce mode de stérilisation pour la suite de l'étude.

Les différents sols étudiés ont été stérilisés à une dose de 30 kGrays après conditionnement en sachets hermétiques de 1 kg de sol ou en microcosmes constitués de flacons contenant 5 ou 30 g de sol humide.

II-1-1-3 Le sol brun lessivé sous culture

Situé comme le sol de prairie dans une zone d'épandage fluvio-glaciaire, le sol cultivé utilisé pour cette étude peut être considéré comme représentatif d'une grande partie des sols européens sous culture. Ce sol est celui des terrains de la ferme expérimentale du lycée agricole de la Côte Saint André (Isère). Les principales caractéristiques du sol prélevé et tamisé à 2 mm sont reportées dans le tableau I-3 et l'annexe 3.

Argiles	20,9%	Carbone organique = 1,05%
Limons	47,9%	(correspond à environ 1,8%
Sables	29,4%	de matière organique).
		Rapport C/N : 8,7
		pH eau = 5,8
<u>Potentiels de rétention de l'eau :</u>		
pH	3	4,2
Humidité	27,8	12,9
pondérale (%)		

Tableau II-3 : Principales caractéristiques du sol brun lessivé sous culture

La culture intensive associée aux apports d'engrais minéraux a provoqué un abaissement sensible des teneurs en matière organique par comparaison avec les sols de même type sous prairie permanente, ce qui facilite les études de transfert de soluté, en particulier du PCP.

Ce sol est plus limoneux et plus acide que le précédent, il est donc aussi plus fragile (lessivage). Ses propriétés hydriques sont nettement différentes du précédent, en particulier sa capacité de rétention de l'eau qui est beaucoup plus faible, ce qui est dû à une plus faible teneur en colloïdes, argiles et surtout colloïdes organiques.

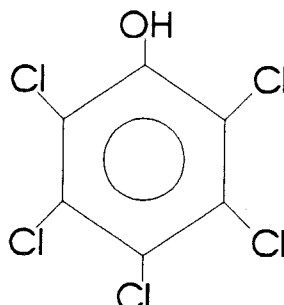
Comme pour le sol de prairie, la distribution de la biomasse microbienne a été établie après son fractionnement physique. Les résultats sont présentés dans le tableau II-4 :

Fractions (μm)	< 2	2-20	20-50	50-250	> 250	Total
Minéraux % du total	17	16	21	32	14	
Biomasse microbienne % du total	32	38	11	9	10	234 $\mu\text{g C.g}^{-1}$

Tableau II-3 : Distribution de la biomasse microbienne dans les fractions minérales du sol brun lessivé sous culture

II-1-2 La molécule modèle

II-1-2-1 Pourquoi le PENTACHLOROPHENOL?



Le pentachlorophénol (PCP) est un xénobiotique utilisé depuis les années 1930 pour ses propriétés biocidales puissantes dans l'industrie et l'agriculture. Il est utilisé en particulier comme fongicide pour le traitement du bois et la protection des peintures, mais aussi comme pesticide pour la protection des cultures de riz notamment dans les pays asiatiques. Sa production annuelle atteignait 50000 tonnes dans les années 70-80 (Crosby et al. 1980).

Son très large spectre d'utilisation fait qu'il est responsable d'une pollution diffuse importante et que sa présence s'est généralisée dans l'environnement, c'est ainsi que l'on a pu le retrouver dans 80% des urines analysées dans un institut spécialisé aux Etats Unis (Crosby et al. 1980).

Par ailleurs, le PCP compte parmi les produits les plus toxiques accessibles au public, d'abord par ses propres effets nocifs essentiellement vis à vis des organismes supérieurs et de la microflore fongique, mais aussi par les impuretés que l'on peut retrouver dans ses différentes formulations et en particulier des dioxines chlorées produites lors de sa synthèse.

Le PCP a donc été choisi comme molécule modèle dans le cadre de cette étude pour son universalité dans l'environnement, rendant l'étude de son comportement indispensable mais aussi pour ses propriétés physico-chimiques intéressantes et en particulier sa faible pression de vapeur qui fait que cette molécule est peu volatile, ce qui permet de s'affranchir des problèmes de pertes par évaporation lors des différents essais.

Cette molécule est intéressante également parce qu'elle est ionisable. C'est un acide faible, et très peu d'études dans les sols ont été menées sur des produits non neutres et encore moins sur des produits dont le pKa est

relativement proche du pH de nombreux sols cultivés, ce qui rend leur comportement physico-chimique encore plus complexe (Lee et al. 1990). C'est un des points qui intéressait plus particulièrement les partenaires industriels, notamment la société Rhône-Poulenc, productrice de PCP dont l'utilisation est aujourd'hui interdite en France.

Le PCP peut donc servir de modèle pour l'étude du devenir des chlorophénols dont il est représentatif et qui constituent une grande partie des polluants rencontrés dans l'environnement (Salkinoja-Salonen et al. 1989, Kitunen 1987) à cause de leur rémanence, mais également d'autres familles de produits chimiques dont il peut être un dérivé, notamment de polymères aromatiques.

D'un point de vue plus fondamental, cette molécule est intéressante pour sa structure chimique puisqu'elle est constituée d'un cycle aromatique portant une fonction hydroxyle, c'est donc un phénol. Les phénols sont des molécules naturelles présentes dans tous les sols pourvus de matière organique.

Le PCP peut également servir de modèle pour l'étude du comportement de molécules naturelles (les phénols) puisque du point de vue du devenir biologique, sa dégradation passera tôt ou tard par le cycle de dégradation des molécules aromatiques naturelles commun à la majorité des microorganismes des sols (Wallinofer & Engelhardt 1985).

Enfin, le PCP est un produit intéressant car il possède 5 atomes de chlore et que vraisemblablement, c'est uniquement cette liaison carbone-halogène qui doit être considérée comme xénobiotique, bien que de nombreuses molécules organo-halogénées soient rencontrées dans la nature. C'est le cas en particulier de certains antibiotiques produits par des fonges, certains étant même des analogues structuraux du PCP comme par exemple la drosophitine A (Birkinshaw 1965).

II-1-2-2 Principales utilisations et formulations du PCP

Le pentachlorophénol est utilisé à 90% sous sa forme moléculaire (non ionisée) généralement dissous dans un mélange de solvants pétroliers ou encore sous forme solide (cristallisé).

80% de la masse annuelle produite sont utilisés pour le traitement du bois (charpentes, poteaux électriques...) contre des champignons ou des insectes nuisibles.

10% sont utilisés par l'industrie chimique comme additif des peintures (white spirit par exemple) ou pour l'agriculture (comme pesticide polyvalent). Enfin, les 10% restants sont utilisés sous forme ionisée : PCP-Na, PCP-K ou encore sous la forme d'ester de PCP : lauryl PCP dans l'industrie textile et papetière ou dans des nettoyeurs ménagers (Cirelli 1978).

II-1-2-3 Toxicité du PCP

Le PCP est un composé hautement toxique de par sa structure chimique : constituée d'un cycle aromatique et de 5 atomes de chlore, c'est une molécule plate et de petite taille pouvant s'introduire dans de nombreuses macromolécules et assemblages biochimiques. On sait en particulier que le PCP peut jouer le rôle de découpleur, c'est donc un inhibiteur de la phosphorylation oxydative (chaîne respiratoire) (Saber & Crawford 1985). En revanche, le PCP ne semble pas être cancérigène, bien que certaines études montrent qu'il peut être embryotoxique (Rao 1978).

Espèce	Voie	Mesure	Dose letale (mg.kg-1)
Rat	Orale	DL50	146
"	Dermique	"	320
"	Inhalation	"	11,7
"	Intrapéritonie	"	420
Souris	Orale	"	130
"	Dermique	"	261
Lapin	Orale	"	48
Mouton	Orale	"	550
Veau	Orale	"	120
Poisson rouge	Eau	CL50	0,14 (mg.l ⁻¹)
Saumon	Eau	CL50	0,22 (mg.l ⁻¹)

DL50 : Dose de produit entraînant 50% de mortalité

CL50 : Concentration de produit entraînant 50% de mortalité

Tableau II-5 : Toxicité du Pentachlorophénol vis à vis de quelques organismes supérieurs (D'après Crosby et al. 1980)

On peut voir dans le tableau II-5 l'effet du PCP sur quelques organismes supérieurs. On observe en particulier que la dose létale du PCP en solution est très faible pour les poissons : du même ordre de grandeur que des concentrations observées ponctuellement dans l'environnement.

En ce qui concerne l'impact du PCP sur les écosystèmes aquatiques et terrestres, des études récentes ont permis d'évaluer l'effet toxique du PCP et de ses dérivés sur la microflore et la microfaune.

Feind (1988) a montré que le PCP n'affectait les populations d'un mésocosme aquatique qu'à partir d'une concentration de $0,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, maintenue pendant 8 semaines. Il a constaté essentiellement un effet sur le phytoplancton et la faune aquatique, avec néanmoins apparition dans le milieu d'ions chlorures significative d'un processus de dégradation.

Par ailleurs, il semble (Venkateswarlu 1993) qu'une concentration en PCP de 100 ppm n'ait pas d'effet sur les cyanobactéries mais que les algues vertes soient totalement supprimées.

Lamar (1990) a testé l'effet du PCP sur une série de champignons du genre *Phanaerochete*. Il a montré que pour la plupart des souches, une concentration de 5 ppm empêche la croissance hyphale. Les souches résistantes présentaient la capacité à transformer le PCP en Pentachloroanisole, plus toxique que le PCP lui-même, avant d'entreprendre sa minéralisation partielle.

Sato (1987) a montré par des études en colonnes de sols et avec des dénombrements de microflore, que celle-ci pouvait augmenter en présence de fortes concentrations de PCP (jusqu'à $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Il a constaté en particulier une augmentation du nombre de cellules à gram négatif et de cellules PCP résistantes, bien que l'augmentation de la concentration semble réduire sensiblement les activités microbiennes dans le sol.

Dans une étude sur un sol de forêt de hêtre, Schönborn (1990) a montré que l'addition régulière de PCP entraînait une diminution de la biomasse microbienne et de la respiration pour une dose de $10 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, alors qu'avec une dose de $50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, la biomasse diminuait également mais la respiration augmentait. Ce phénomène est interprété comme

correspondant à l'activité des cellules PCP résistantes utilisant les nutriments issus des cellules tuées par le PCP.

Toutes ces études et d'autres menées dans différents écosystèmes (Pignatello et al. 1986, Ruckdeschel et al. 1987, Zelles et al. 1989) ont permis de montrer que le PCP présente un large spectre de toxicité, et que suivant les conditions et les concentrations, on peut observer des effets variés pouvant conduire à des interprétations contradictoires. Il semble néanmoins que le PCP, malgré son aspect récalcitrant (cycle saturé en atomes de chlore) soit capable d'induire chez la plupart des organismes une forme de résistance pouvant même conduire dans certains cas à la biodégradation ou pour le moins à la transformation du produit initial.

II-1-2-4 Préparation des solutions de PCP

Le pentachlorophénol utilisé pour cette étude est un produit Fluka Chemika (Suisse) pour analyses, pur à 99% sous forme cristalline.

Toutes les solutions de PCP ont été préparées avec de l'eau distillée ou déminéralisée. La faible solubilité de ce composé nous oblige à utiliser un protocole particulier pour la préparation des solutions. Il faut en effet augmenter le pH des solutions aqueuses par l'intermédiaire d'une solution de potasse 0,01N, permettant la solubilisation du soluté, puis neutraliser l'excès de potasse par addition d'acide sulfurique. On évite l'apport de chlorure dans les solutions, mais on introduit une certaine quantité de sulfate de potassium (environ 0,01mole par litre) pouvant entraîner une augmentation de la force ionique de ces solutions.

En ce qui concerne les expérimentations effectuées en colonnes de sol, le PCP n'est ajouté à la solution d'eau du sol qu'une fois celle-ci mise en équilibre avec la matière solide étudiée. Pour cela, on effectue une percolation à travers la colonne de sol en circuit fermé jusqu'à ce que la conductivité électrique de la solution soit constante, on ajoute alors le PCP à la solution du sol de la même manière que pour les solutions préparées avec de l'eau pure.

Le PCP a été utilisé tout au long de cette étude, à des concentrations de 10, 30, 50 ou 100 mg.l⁻¹. Toutes les expérimentations de mise au point ou de caractérisation ont été effectuées avec une concentration de 10 mg.l⁻¹, soit 37,7 µmol. l⁻¹.

II-1-2-5 Les méthodes analytiques

Les dosages de PCP dans les solutions ont été effectués par différentes techniques suivant le type de solutions analysées.

Les solutions de PCP dans l'eau distillée, ont été analysées en routine en spectrophotométrie UV. Le PCP constitué d'un cycle aromatique substitué par un OH, possède un pic d'absorption caractéristique à 250 nm, et en raison des substituants Cl (effet bathochrome) un deuxième maximum d'absorption à 319 nm à pH neutre (forme phénate) et à 300 nm à pH acide (forme phénol) (figure II-1) :

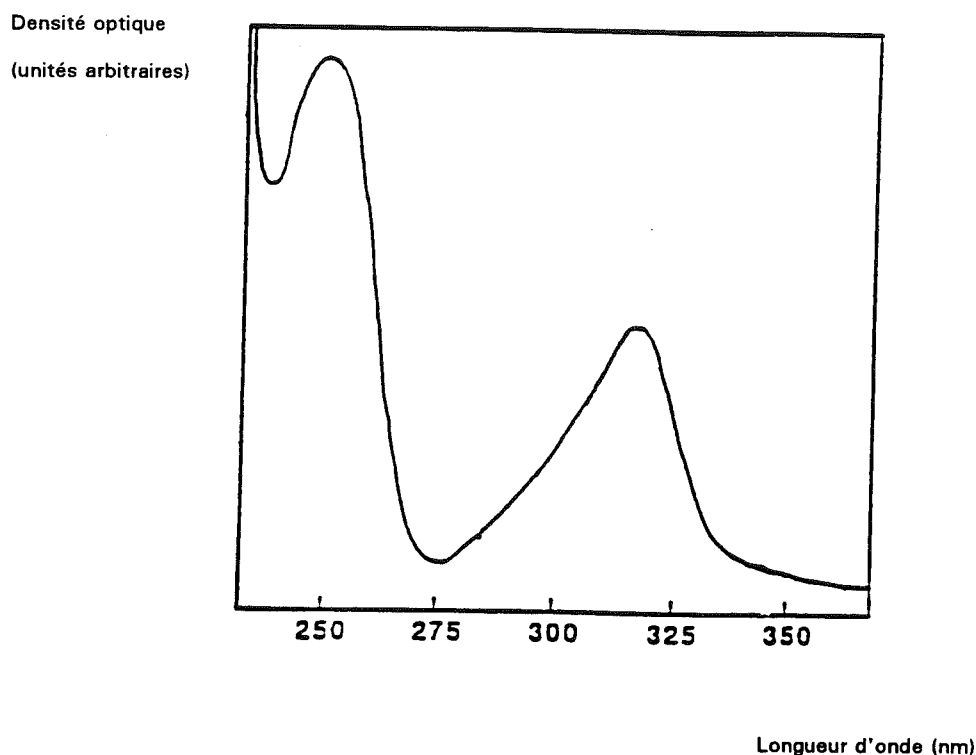


Figure II-1 : Spectre d'absorption UV du pentachlorophenol

Les coefficients d'extinction moléculaire ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) sont respectivement de 5100 et 2400 à 250 et 300 nm (Boule P. comm. perso.). Les analyses ont été effectuées sur un appareil Kontron Uvikon 810 (Lyon) ou Shimadzu UV 160A (Grenoble) après étalonnage des concentrations en fonction de l'absorbance ou de la hauteur des pics d'absorption.

Pour les analyses de PCP dans les suspensions bactériennes ou dans les solutions de sol, du fait des interférences dues à la présence des cellules ou de substances organiques dissoutes (notamment les produits aromatiques), nous avons été amenés à utiliser la chromatographie liquide

à haute pression (CLHP) permettant une bonne séparation du PCP et des contaminants des solutions. La séparation peut être améliorée par la présence d'une précolonne retenant en particulier les corps bactériens et les colloïdes minéraux et organiques.

Une partie des analyses a été effectuée dans le laboratoire d'analyse de Rhône Poulenc Industrialisations (Décines, Rhône) sur un appareil Merck avec détecteur électrochimique type EG&G Model 400 équipé d'une colonne Nucléosil C18, 5 μ m de 150 x 4,6 mm, thermostatée à 30°C, l'éluant étant un mélange volumique 50/50 d'acétonitrile et d'eau.

La majorité des analyses de PCP dans les solutions de sol ont été effectuées au Service Central d'Analyse (SCA) du CNRS à Solaize sur un appareil Hewlett Packard (1090M) avec détection à barrette de diode équipé d'une colonne Brownlee RP8, 5 μ m de 100x2,1 mm et d'une précolonne du même type mais plus courte : 30x2,1 mm. L'éluant utilisé est un mélange (45:55 V/V) d' NH_4COOH (0,1 M), dont le pH est amené à 2,5 avec de l'acide phosphorique, et d'acétonitrile, le tout étant thermostaté à 40°C.

II-2 Estimation et représentation de la fixation

Au cours de ce travail, nous avons voulu appliquer les différents principes décrits précédemment (I-3) au cas particulier représenté par le pentachlorophénol.

La description des interactions du PCP avec les différents milieux poreux étudiés en présence d'un écoulement sera effectuée dans le chapitre V.

II-2-1 Les principales propriétés physico-chimiques du PCP

Le PCP étant une molécule ionisable, ses propriétés physico-chimiques varient suivant son état moléculaire, ce qui peut expliquer la relative dispersion des valeurs de ses principales caractéristiques citées dans la

littérature. Quelques valeurs moyennes sont représentées dans le tableau II-6 :

PROPRIETES du PCP	
Poids moléculaire (g.mol^{-1})	266,5
Point de Fusion	190°C
Point d'Ebullition	309°C
Pression de Vapeur (mm Hg)	
0°C	$1,7.10^{-5}$
20°C	$1,7.10^{-4}$
50°C	$3,1.10^{-3}$
Solubilité dans l'eau pure : (mg.l^{-1})	
0°C	5
20°C	14
30°C	20
50°C	35
Solubilité dans des solvants organiques : (g.l^{-1})	
Méthanol	180
Acétone	50
Benzène	15
Densité (g.cm^{-3})	1.978
Constante de dissociation : (pK_A)	4.75
Coefficient de partage : (pK_{O-W})	2.15 à 5.86
	(pK_{O-C}) 2.95 à 4.52

Tableau II-6 : Principales propriétés physico-chimiques du pentachlorophénol (D'après Crosby et al. 1980).

La solubilité du PCP varie relativement peu avec la température, mais est très sensible aux variations de pH (Alary et al. 1992). En effet, le PCP moléculaire est peu hydrosoluble, mais sa solubilité augmente fortement avec le pH pour atteindre quelques grammes par litre (Alary et al. 1992).

A un pH de 6,7 (2 unités au dessus du pK_A), le PCP est ionisé à 99%. Cette caractéristique a été utilisée pour la préparation des solutions de PCP. Elle influence également beaucoup le comportement physico-chimique

du PCP dans les sols où l'on rencontre des pH très variables. Les variations de pH peuvent entraîner des variations de concentrations de la phase liquide et perturber les interactions avec la matrice.

On peut donc s'attendre à ce que le PCP non ionisé qui représente la forme majoritairement utilisée, soit presque totalement retenu à la surface des sols et que l'on en retrouve très peu dans les nappes phréatiques (Jury et al. 1987). Dans ce cas, le sol aura pleinement joué son rôle épurateur, le danger de pollution des nappes proviendra donc essentiellement du relargage incontrôlé du PCP resolubilisé ou fixé sur des particules mobilisées.

Il semble donc particulièrement intéressant d'étudier le comportement du PCP ionisé plus soluble et beaucoup plus mobile dans l'eau et potentiellement plus dangereux.

II-2-2 Les principaux mécanismes d'interactions connus

Le PCP étant une molécule ionisable, il faut envisager sa fixation sous ses deux formes moléculaires pH - dépendantes.

La plupart des études sur le PCP ont montré que la forme non ionisée se fixe préférentiellement et de manière très forte sur la matière organique (Choi & Aomine 1974-a, Lee et al. 1990, Schellenberg et al. 1984) et implique des liaisons hydrophobes et des processus de partition donc de solvation. Des liaisons non spécifiques du type Van der Waals et des liaisons hydrogènes ont également été observées (Cheng 1990).

Des mécanismes comme de l'échange ionique, des liaisons hydrogènes, des interactions de type Van der Waals (Choi & Aomine 1974 a) ou encore des liaisons sous forme de paires d'ions (après que le PCP ait formé un sel avec les différentes espèces ioniques de la solution du sol) ont été observés (Westall 1985, Belkessam 1993).

Sous forme ionisée, le PCP interagira soit de la même manière que le PCP moléculaire, selon la théorie de Bjerrum (Lee et al. 1990), soit par transfert de charge de la matrice solide vers le noyau aromatique (Westall 1985, Schellenberg et al. 1984).

D'après de nombreux auteurs (Lee et al. 1990, Choi & Aomine 1974b, Schellenberg et al. 1984) le principal facteur gouvernant la fixation du PCP dans les sols est le pH puisqu'il détermine le pourcentage de molécules ionisées ou non. Pour la majorité des chlorophénols, le

coefficient de partage entre la matrice solide et l'eau peut être calculé par l'équation (Lee et al. 1990) :

$$K_{oc} = K_{ocn} \Phi_n + K_{oci} (1 - \Phi_n) \quad (II-1)$$

où K_{ocn} est le coefficient de distribution de la forme neutre (de 0 à 1) et K_{oci} celui de la forme ionisée, Φ_n étant égal à :

$$\Phi_n = \frac{[PCP_n]}{[PCP_{tot}]} = (1 + 10^{pH + pK_A})^{-1} \quad (II-2)$$

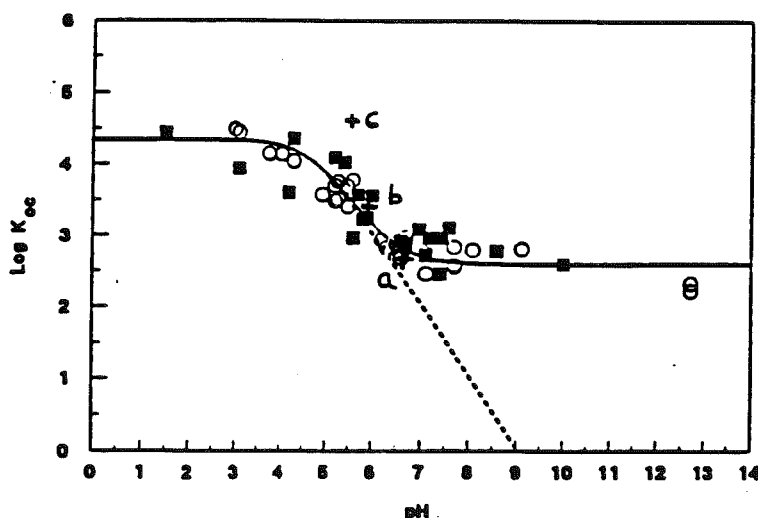
$[PCP_n]$ est l'activité chimique de la forme neutre du PCP

$[PCP_{tot}]$ est l'activité chimique totale du PCP

Si la forme ionisée est très faiblement fixée par rapport à la forme neutre, alors $K_{ocn} \gg K_{oci}$ et on obtient :

$$K_{oc} = K_{ocn} \Phi_n \quad (II-3)$$

Sur la base de ces équations, Lee et al. (1990) ont pu ajuster une courbe à des résultats expérimentaux mettant en évidence l'importance du pH (figure II-2) pour l'adsorption du PCP.



+ a, b, c, représentent les résultats expérimentaux obtenus au § II-2-4-4-a

— prise en compte de l'adsorption des 2 formes de PCP (éq. II-1)

----- prise en compte de l'adsorption du PCP non ionisé uniquement (éq. II-3)

Figure II-2 : Effet du pH sur le coefficient de partage du PCP entre l'eau et la matière organique (d'après Lee et al. 1990)

Ces auteurs ont ainsi conclu que pour un $\text{pH} < 7$, le taux de fixation du PCP dépend essentiellement de Φ_n et du taux de matière organique, alors que pour un $\text{pH} > 7$, il faut considérer l'adsorption du PCP ionisé et du sel neutre formé avec un cation métallique (M-PCP^0). Ce dernier mécanisme étant directement lié à la force ionique, à la nature des cations présents et au pH.

La fixation de la forme ionisée du PCP met en jeu des forces relativement faibles, conduisant à une désorption beaucoup plus grande que pour la forme neutre.

Un phénomène de changement de phase du PCP (précipitation) a également été observé (Choi & Aomine 1974a), essentiellement au contact de particules argileuses comme l'halloysite ayant un pH de surface faible où le produit de solubilité du PCP est atteint. Choi & Aomine (1974b) ont ainsi obtenu pour un sol à pH faible du type andosol (sol riche en halloysite), une isotherme d'adsorption caractéristique des molécules hydrophobes (Huang 1980) très dépendante de l'hydrosolubilité de la molécule (figure II-3) et sans hystérésis.

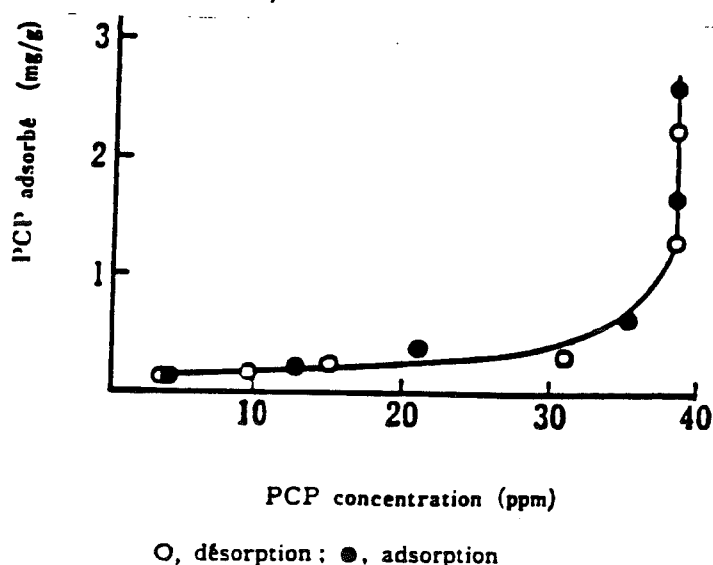


Figure II-3 : Isotherme d'adsorption du PCP dans un sol à allophane : mise en évidence de la précipitation du PCP (d'après Choi & Aomine, 1974b)

Ces auteurs ont montré que certaines argiles possèdent un réel pouvoir adsorbant vis à vis du PCP et pouvant être différencié de la précipitation.

Cependant, les résultats concernant l'adsorption sur les argiles sont variables, ainsi Fabre (1990) a trouvé un K_d de $6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ dans le cas de la

Kaolinite à un pH de 5,2, alors que Lee et al. (1990) n'observe aucune adsorption du PCP sur cette même Kaolinite.

De même pour des oxydes d'aluminium et de fer, Lee (1990) n'observe pas d'adsorption alors que Mc Bride (1991) présente ces oxydes comme d'excellents adsorbants pour les phénols substitués.

En ce qui concerne les facteurs autres que le pH affectant la fixation du PCP, il semble qu'une force ionique élevée augmente le taux de fixation (Lee et al. 1990, Schellenberg et al. 1984, Karickhoff 1984) de manière faible mais néanmoins plus sensible avec le PCP ionisé qu'avec le PCP neutre. Ainsi la diminution des interactions PCP/H₂O diminuerait la solubilité alors que l'augmentation des interactions PCP/ion et la formation de paires d'ions favoriseraient des interactions non ioniques avec la surface de l'argile.

L'effet de la température semble aussi relativement faible et variable, Choi & Aomine (1974a) ont constaté des effets positifs (+ 12% de fixation) pour une variation de 30°C dans le cas d'interactions à dominante ioniques alors que pour des mécanismes faisant intervenir des liaisons faibles, l'effet d'une même variation de température est négatif (-8% de fixation).

La présence de réactifs organiques semble augmenter le taux de fixation du PCP sur divers adsorbants. Fabre (1990) constate ainsi la promotion de l'adsorption du PCP par des charbons actifs en présence d'acides fulviques malgré l'augmentation de la solubilité observée conjointement surtout à pH faible, mettant en évidence une interaction indirecte, la matière organique jouant alors le rôle d'intermédiaire ou de pont entre les charbons actifs et le PCP.

A l'inverse, Lee et al. (1991) et Nkeddi-Kizza et al. (1985) constatent une diminution de la fixation du PCP sur un sol très sableux (96% de sable) avec l'augmentation de la fraction de solvant organique (méthanol) augmentant la solubilité et donc la mobilité du PCP dans ce sol.

II-2-3 Mesure des principales propriétés physico-chimiques du PCP

Dans le cadre de cette étude, une partie du travail concernait l'établissement des propriétés physico-chimiques du PCP. Ce travail a été

effectué en grande partie à l'ENSC de Rennes au laboratoire CNGE du Pr Martin.

Nous présentons ici une partie de ces résultats ainsi que ceux obtenus dans notre laboratoire et dans le laboratoire de Microbiologie des sols (Lyon) du Pr Bardin.

II-2-3-1 Effet du pH sur la solubilité

Comme le laissait prévoir le caractère ionisable du PCP, sa solubilité est extrêmement dépendante du pH et augmente rapidement avec la fraction de molécules ionisées (figure II-4) (Alary et al. 1992).

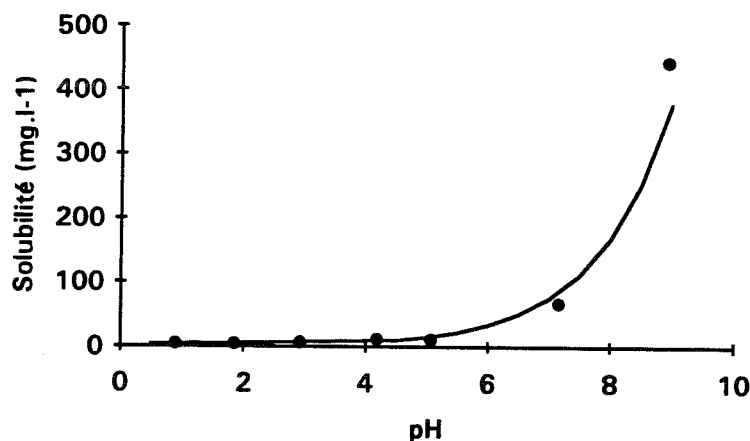


Figure II-4 : Evolution de la solubilité du PCP en fonction du pH

La mesure de la solubilité a été effectuée selon le protocole de la norme AFNOR NFT-20046 (Alary et al. 1992), l'analyse des concentrations étant effectuée par spectrophotométrie U.V. et les solutions tamponnées aux pH souhaités.

On observe, que la solubilité du PCP dans l'eau en fonction du pH peut être représentée par deux relations mathématiques distinctes, la première allant, jusqu'à un pH correspondant au pK_A du PCP :

$$S = 3.386.10^{0,12\text{pH}} \quad (\text{II-4a})$$

puis au dessus du pK_a :

$$S = 0.25976.10^{0,3514\text{pH}} \quad (\text{II-4b})$$

II-2-3-2 Effet de la force ionique et de la nature des ions en solution sur la solubilité du PCP

Les résultats obtenus à Rennes dans le cadre de ce projet de recherche concernant l'effet de la concentration et de la nature des ions en solution (Belkessam 1993) ont permis de montrer certains phénomènes significatifs.

La solubilité du PCP augmente en présence de chlorure de magnésium d'un facteur 2 alors qu'elle diminue en présence de chlorure de calcium et surtout de fer sous diverses formes salines.

Les ions chlorures semblent également avoir un effet positif sur la solubilité du PCP, contrairement aux ions sulfates.

En ce qui concerne l'effet de la force ionique, nous avons constaté qu'une augmentation d'un facteur 10 de la concentration en CaCl_2 ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ n'avait aucune influence sur l'hydrosolubilité du PCP.

Pour ce qui est de l'influence négative du fer, il semble qu'elle soit due essentiellement à l'adsorption du PCP sur les hydroxydes de fer formés au cours de l'expérimentation. Cette adsorption correspond à plusieurs mécanismes possibles (Mc Bride & kung 1991) :

- par des forces faibles types Van der Wals ou dipôle-dipôle
- par liaison hydrogène
- par liaison ionique directe du PCP ionisé sur la surface de l'hydroxyde

II-2-3-3 Effet des groupements fonctionnels sur la solubilité du PCP

La nature et la position des substituants entraînent des modifications des propriétés physico-chimiques de la molécule de base et c'est le cas pour le phénol. On peut voir sur la figure (II-5) l'effet du nombre d'atomes de chlore sur la solubilité des chlorophénols :

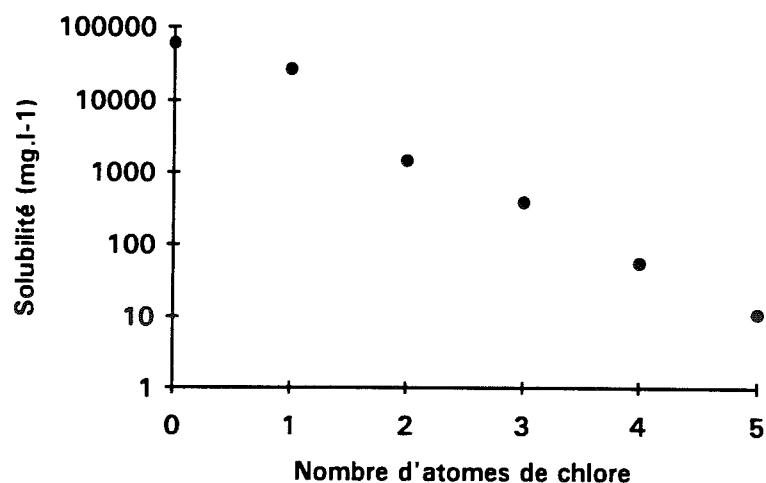


Figure II-5 : Effet du nombre d'atomes de chlore sur la solubilité des chlorophénols

En même temps que la solubilité, on constate une diminution de pK_A et une augmentation de K_{OW} (tableau II-7) :

	phénol 0 Cl	MCP 1 Cl	DCP 2 Cl	TCP 3 Cl	TeCP 4 Cl	PCP 5 Cl
pK _A	10,0	9,37	6,8	6,4	6	4,75
log K _{OW}	1,48		2,9	3,7	4,4	5 - 5,2

Tableau II-7 : Influence du nombre d'atomes de chlore sur les valeurs de pK_a et log K_{OW} des chlorophénols

La présence d'atomes de chlore provoque donc l'augmentation de l'hydrophobicité de la molécule donc de K_{OW} qui est directement relié à K_{OC} (Chiou et al. 1979). Ainsi Stumm (1992) présente l'adsorption de quatre chlorobenzènes en fonction du taux de matière organique, figure II-6:

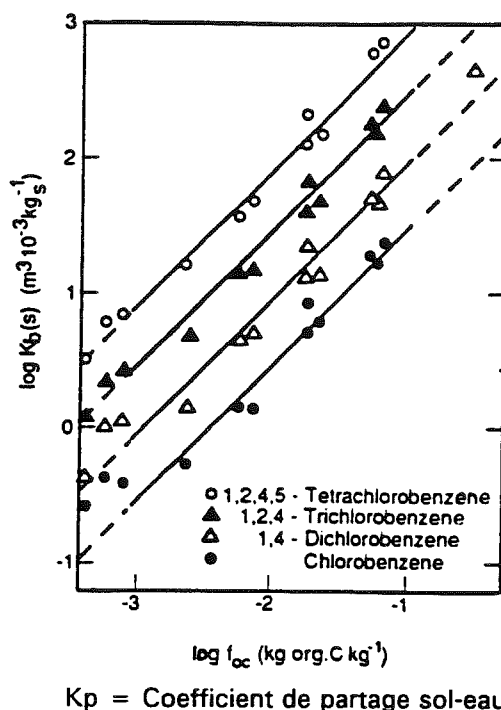


Figure II-6 : Effet du nombre d'atomes de chlore sur le coefficient de distribution de 4 chlorobenzènes en fonction de f_{OC} (d'après Stumm 1992)

II-2-4 Estimation de la fixation du PCP sur différents adsorbants

Comme nous l'avons précisé précédemment, une des techniques possibles pour l'identification des mécanismes d'interaction d'un xénobiotique avec une matrice poreuse consiste à découpler ces mécanismes potentiels par l'utilisation de milieux poreux de complexité croissante. C'est cette approche que nous avons suivie.

II-2-4-1 Fixation du PCP sur le sable de Fontainebleau

Le sable de fontainebleau étant un matériau composé à plus de 99% de silice pure (SiO_2), il est à priori peu interactif avec les composés organiques. C'est pour cette raison qu'il a été choisi, facilitant ainsi les étapes de mises au point expérimentales et la caractérisation des paramètres hydrodynamiques en colonne indépendamment des interactions physico-chimiques.

A un pH de 8,4 (où le PCP est entièrement ionisé) aucune adsorption n'a été observée, à l'équilibre, après 72 heures de contact (Alary et al. 1992) ($K_d = 0$). Le pentachlorophénolate ne semble donc pas interagir avec une matrice siliceuse (au moins à ce pH) dans ces conditions opératoires.

II-2-4-2 Fixation du PCP sur l'argile

Au vu de la capacité d'échange cationique du sol de la Côte Saint André (annexe 3), il semble que les argiles de ce sol soient *pro parte* des Kaolinites ferrières (2/3) et des argiles à forte surface spécifique (smectites ou interstratifiées) (1/3) (Jocteur Monrozier comm. perso).

Un essai d'adsorption du PCP à 50 mg.l^{-1} sur la Kaolinite à pH 7,9 a montré que 7,6% de la quantité initiale étaient adsorbés sur l'argile soit $0,011 \text{ mg/g}$ correspondant à un K_d de $0,24 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ (dans l'hypothèse d'un équilibre indépendant). Cette valeur de K_d peut être comparée à celle obtenue par Fabre (1990) pour le même couple soluté-adsorbant à pH 5,2 qui est de $6 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$.

Il semble donc que l'adsorption du PCP sur de la Kaolinite pure soit dépendante du pH et que la forme non ionisée du PCP interagisse préférentiellement avec les surfaces ce qui implique deux mécanismes possibles pour la disparition du PCP en solution, soit par précipitation (Choi & Aomine 1974a) soit par des liaisons par transfert de charge de la surface des argiles vers le noyau aromatique du PCP puisque à pH faible, le pH de la surface des particules argileuses est faible conduisant à une forte polarisation des molécules d'eau devenant ainsi beaucoup plus réactives.

La figure II-7, montre que la fixation du PCP sur cet argile suit une cinétique rapide puisque 90% du PCP retenu est fixé en 0,5 heures correspondant à une vitesse globale de disparition de la solution de $0,02 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

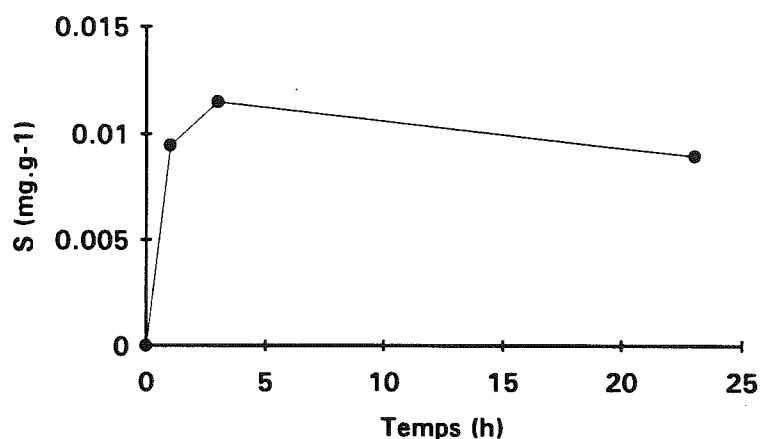


Figure II-7 : Cinétique de fixation du PCP sur la Kaolinite (Belkessam, 1993)

II-2-4-3 Fixation du PCP sur les acides humiques

Le PCP étant une molécule très hydrophobe ($K_{ow} \cong 100000$), on peut prévoir de nombreuses interactions hydrophobes. Sa fixation sur la matière organique doit donc être étudiée et quantifiée. Ceci a été fait sur des acides humiques de composition non déterminée et préparés à partir de tourbe par solubilisation dans la soude (Alary et al. 1992).

Une cinétique d'adsorption du PCP à 10 mg.l^{-1} à un pH de 4,7 a été obtenue (figure II-8). On voit que l'équilibre est atteint en moins de trois heures, la concentration en PCP n'évolue plus par la suite.

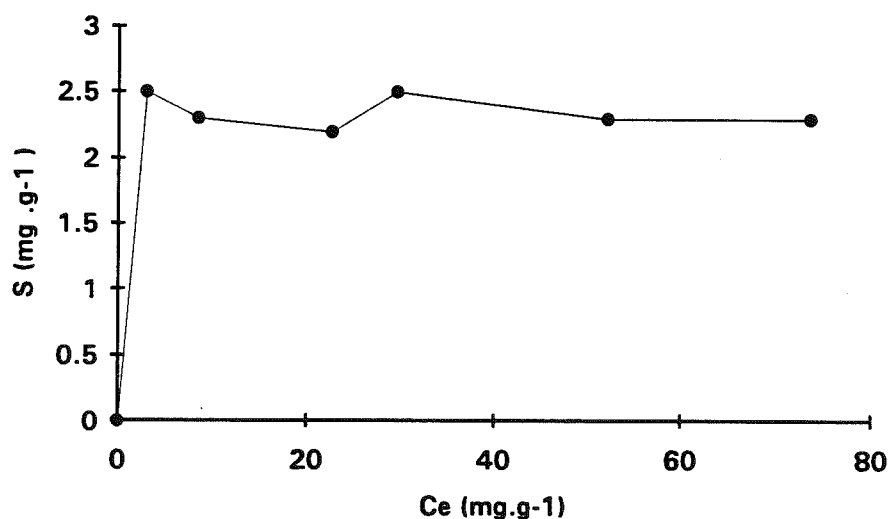


Figure II-8 : Cinétique de fixation du PCP sur des acides humiques (Belkessam 1993)

On observe une quantité de PCP adsorbée de 2,4 mg de PCP par g de substance humique correspondant à un K_{OC} de $3,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ de carbone organique ($C.O. = 0,57.MO$, Briggs 1981) si on suppose une courbe de fixation linéaire avec les acides humiques.

II-2-4-4 Fixation du PCP sur le sol de la Côte Saint André

a/ Etude de l'équilibre

La fixation du PCP a été étudiée sur le sol stérile et non stérile selon le protocole décrit dans l'annexe 4.

Pour un pH de 6,7, on obtient des différences faibles entre les deux courbes de fixation (figure II-9) confirmant ce qui a été dit précédemment, à savoir que la stérilisation des sols par rayonnements gamma n'entraîne pas de modifications physico-chimiques importantes.

En considérant que la fixation du PCP dans ce sol suit un équilibre indépendant, on peut représenter ces courbes de fixation par les modèles linéaires ($S=K.C$) et de Freundlich ($S=K.C^N$), les paramètres correspondants sont présentés dans le tableau II-8.

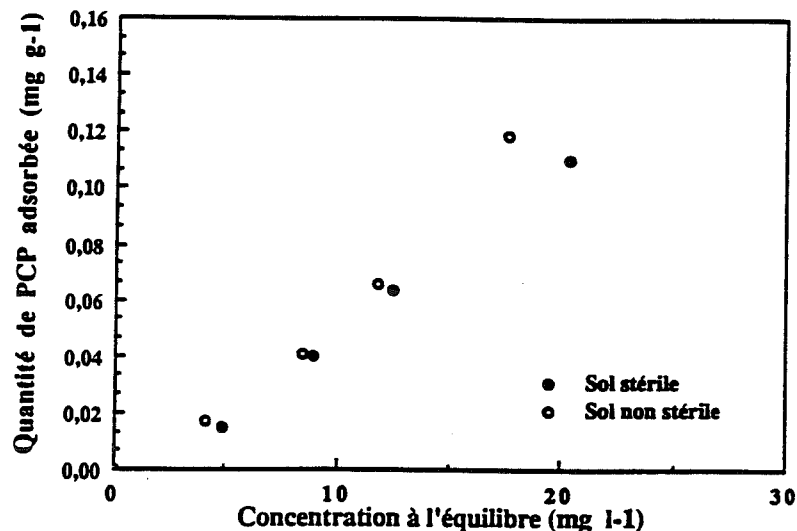


Figure II-9 : Courbes de fixation du PCP sur le sol stérile et non stérile à pH 6,67

Sol	Modèle	K (cm ³ .g ⁻¹) ^N	N	r
Non stérile	Freundlich	0.0175	1.25	0.9969
	linéaire	6.6	1	0.9875
Stérile	Freundlich	0.0296	1.417	0.9959
	linéaire	5.6	1	0.9930

Tableau II-8 : Valeurs des constantes obtenues avec les modèles linéaire et de Freundlich

L'influence du pH sur la courbe de fixation a également fait l'objet d'une étude menée conjointement au Laboratoire de Chimie des nuisances et au Laboratoire de Microbiologie des sols (figure II-10).

On peut voir, comme on s'y attendait, que la fixation est beaucoup plus grande avec la molécule non ionisée, c'est à dire avec un pH faible qu'avec la molécule ionisée mettant ainsi également en évidence des mécanismes d'interaction différents.

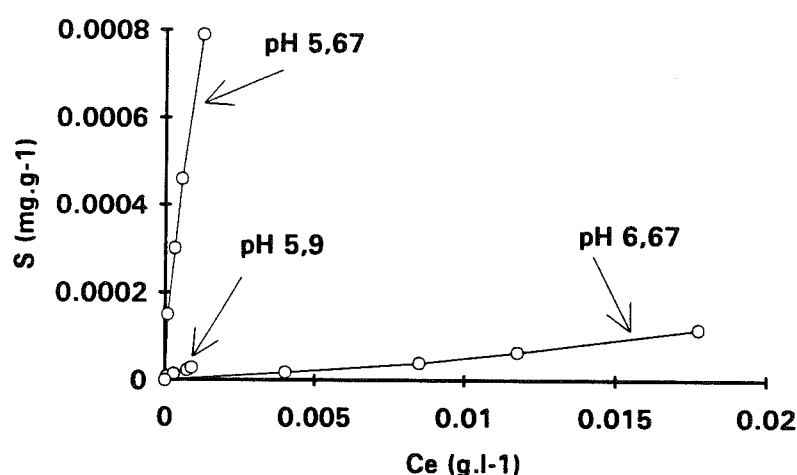


Figure II-10 : Effet du pH sur les courbes de fixation du PCP

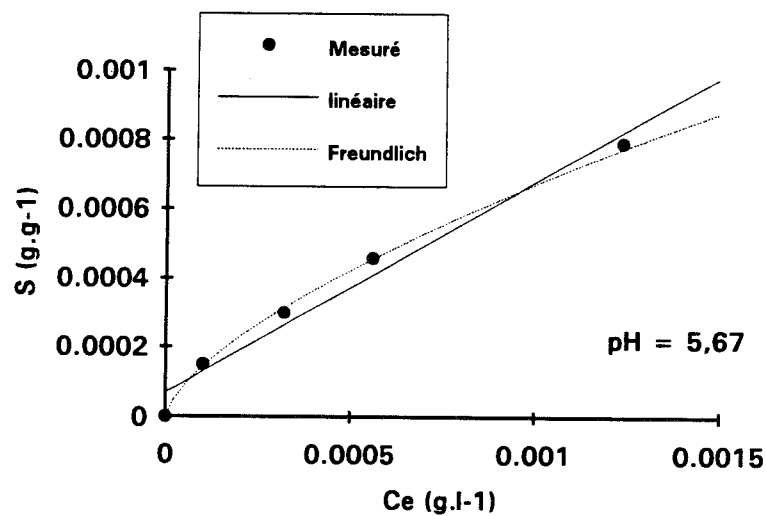
Sur la base du modèle linéaire, on peut estimer K_d pour chacune de ces courbes puis calculer le coefficient K_{OC} correspondant ($CO\% = 1,05$) (tableau II-9) et reporter les valeurs obtenues sur la figure II-2. On constate que les valeurs de K_{OC} obtenues sont en accord avec les valeurs prédites par Lee et al. (1990) d'après l'ionisation du PCP. On peut donc en conclure que le paramètre qui gouverne le comportement du PCP dans le sol est le

pH et que la nature de la matière organique a peu d'influence, c'est surtout sa quantité qui est importante (Koskinen & Harper 1990, Alary et al. 1992).

Sur la figure II-11, les courbes de fixation ont été ajustées avec les modèles linéaire et de Freundlich, les paramètres calculés sont présentés dans le tableau II-9 :

		Freundlich			linéaire		
		K ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{N}$)	N	r	Kd ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	log Koc	r
pH	6,7	0.0175	1.25	0.9969	6,6	2,8	0.9875
	5,9	0.00647	0.831	0.9480	26,5	3,4	0.9711
	5,7	0.00651	0.662	0.9987	566	4,7	0.9787

Tableau II-9 : Paramètres obtenus avec l'ajustement des courbes de fixation du PCP avec les modèles linéaire et de Freundlich à différents pH



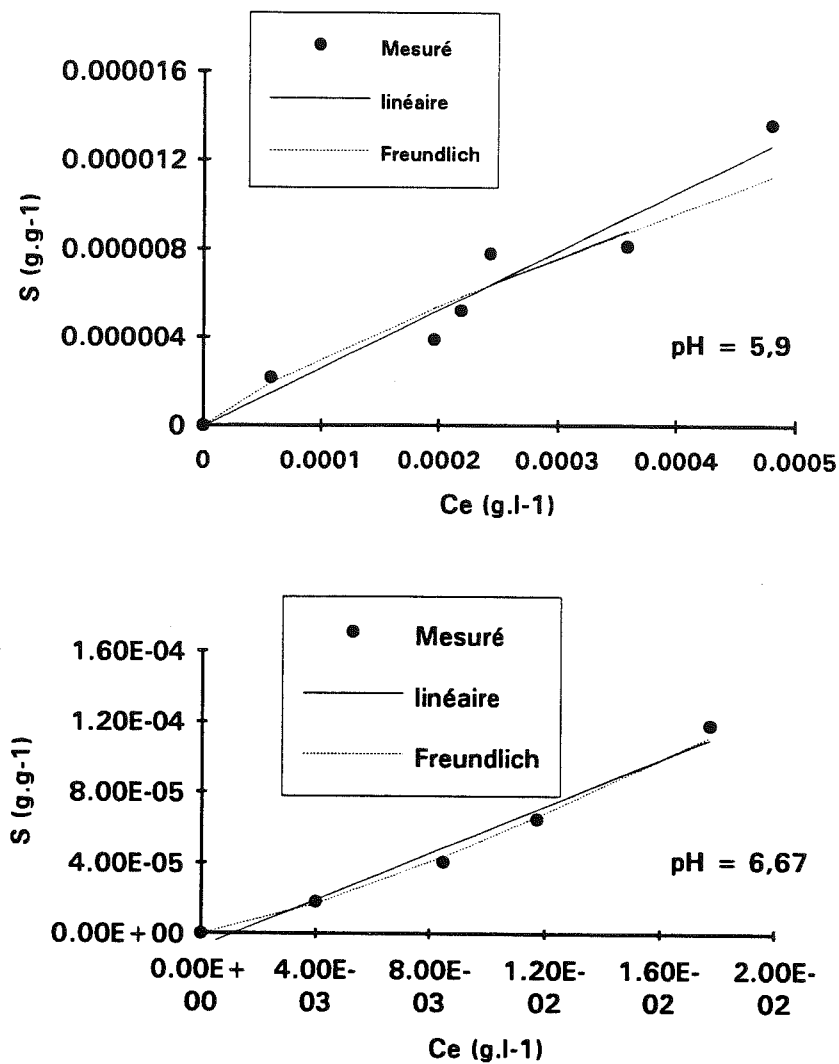


Figure II-11 : Ajustement des courbes de fixation du PCP par les modèles linéaires et de Freundlich

Dans tous les cas, on obtient une bonne corrélation linéaire ou logarithmique (r proche de 1), on peut donc supposer que pour ces valeurs de concentration, les 2 modèles donnent une bonne représentation de la loi d'équilibre de la fixation du PCP, il est donc difficile de dire lequel est le plus adéquat.

En considérant le modèle de Freundlich, on observe que la concavité de la courbe de fixation évolue avec le pH ce qui se traduit par le passage de $N > 1$ à pH élevé à $N < 1$ pour un pH faible en passant par une valeur proche de 1 pour la courbe obtenue à un pH intermédiaire.

On peut donc supposer que l'évolution de N observée correspond à un changement des mécanismes d'interaction impliqués suivant que l'on ait

des interactions du PCP moléculaire ou du PCP ionisé ou des deux en même temps.

b/ Etude de la cinétique

1/ Cinétique d'adsorption

L'étude de la cinétique de fixation du PCP a été effectuée expérimentalement en suivant la quantité adsorbée au cours du temps avec un pH de 6,2 (figure II-12) pour une concentration initiale en PCP de 100 mg.l⁻¹.

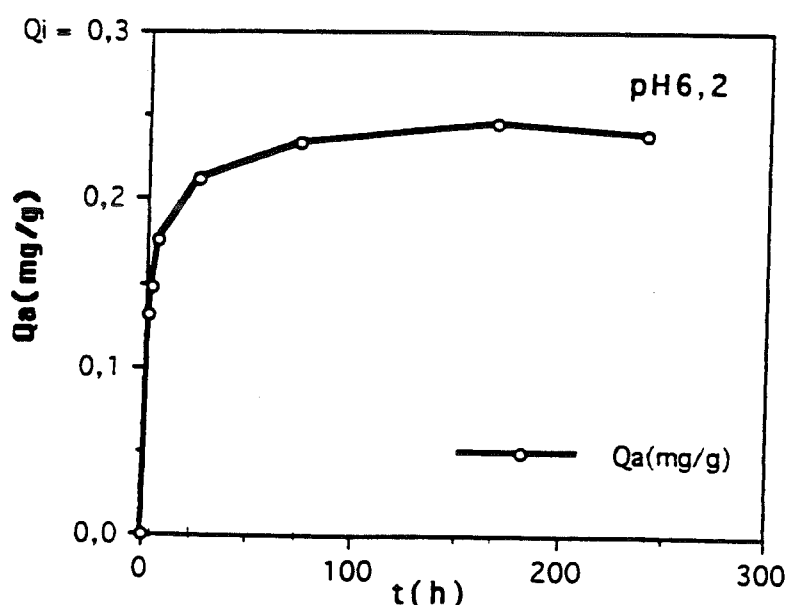


Figure II-12 : Cinétique de fixation du PCP sur le sol cultivé (Belkessam 1992)

On peut observer sur cette figure que près de 50% du PCP introduit est fixé sur le sol en une heure seulement, on a donc une cinétique relativement rapide et correspondant à une vitesse initiale moyenne de 130 μg de PCP.g⁻¹.h⁻¹ soit 0,5 $\mu\text{moles.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Il semble donc que pour le PCP, il y ait une phase d'adsorption rapide suivie d'une phase plus lente avec un équilibre atteint en trois jours (72 heures), et la concentration résiduelle en solution est de 20 mg.l⁻¹ correspondant au produit de solubilité du PCP. Il n'est donc pas impossible qu'un changement de phase du PCP soit survenu au cours de l'expérience.

L'hypothèse de l'existence de deux types de sites de fixation, l'un instantané et l'autre cinétique (Novy Quadri 1993) est donc cohérent au vu de ces résultats.

2/ Cinétique de désorption

L'adsorption des produits chimiques étant par définition un phénomène réversible, il est indispensable de s'intéresser au processus de désorption pour vérifier cette hypothèse. La désorption a été suivie en mesurant la concentration en PCP désorbée par dilution d'une suspension de sol au cours du temps. On a ainsi obtenu, figure II-13, la cinétique de désorption du PCP adsorbé pendant la cinétique d'adsorption précédente. On peut voir que l'équilibre est atteint en une heure, le maximum de désorption étant alors de 0,04 mg/g correspondant à une vitesse de désorption du PCP de $0,15 \mu\text{mole.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

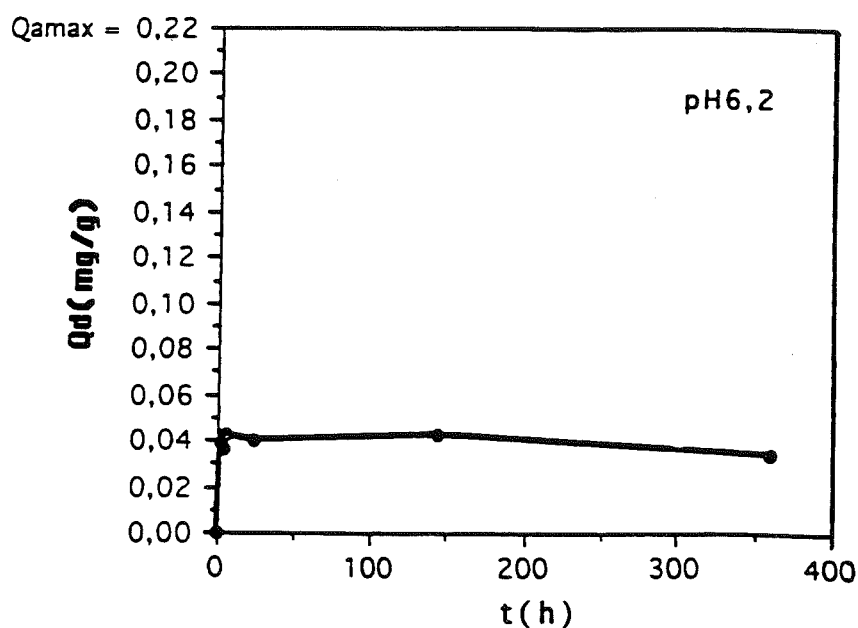


Figure II-13 : Cinétique de désorption du PCP sur le sol cultivé
(Belkessam 1992)

La vitesse de désorption du PCP semble plus faible que celle de l'adsorption, cependant on constate que la masse de PCP désorbé correspond à une concentration de 20 mg.l^{-1} proche du produit de solubilité du PCP à ce pH, on peut donc supposer que c'est ce paramètre qui régit les cinétiques de désorption et d'adsorption.

II-2-4-5 Estimation de la fixation du 2, 3, 5, 6, TeCP

Au cours de l'étude, nous nous intéresserons à la dégradation du PCP par des microorganismes.

La biodégradation du PCP commence obligatoirement par l'élimination d'un atome de chlore qui est remplacé par un hydrogène ou un hydroxyle suivant la voie métabolique.

Les tétra-chlorophénols sont donc des produits de dégradation potentiels. Du fait de la résonance électronique du noyau aromatique du PCP, les atomes de chlore les plus fragiles sont ceux en position para, ortho puis méta, l'étude de la fixation du 2, 3, 5, 6, TeCP est donc tout à fait indiquée.

Une courbe de fixation du TeCP sur le sol cultivé à un pH de 6,2 a été obtenue selon le même protocole que pour le PCP (figure II-14) :

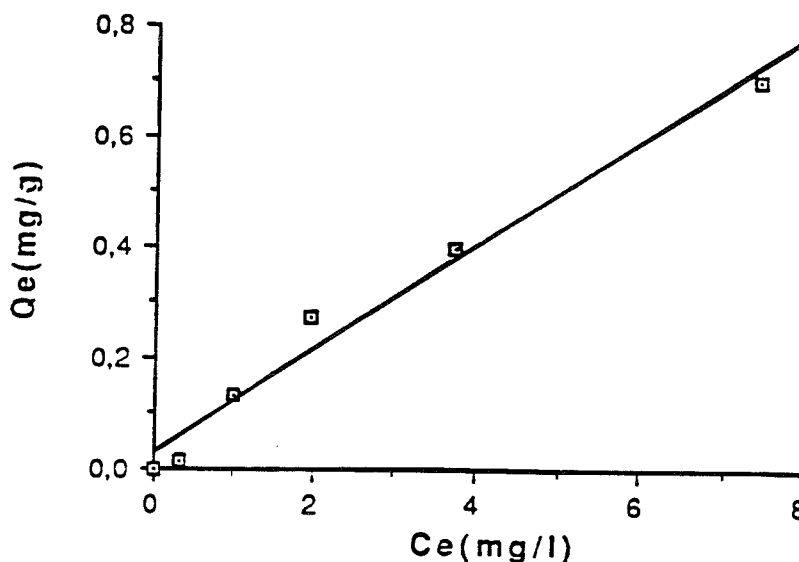


Figure II-14 : Courbe de fixation du 2,3,5,6-TeCP sur le sol cultivé (Belkessam 1992)

Cette courbe de fixation peut être représentée par le modèle linéaire avec une corrélation satisfaisante.

Avec le modèle linéaire, on détermine un coefficient K_d de $93\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ correspondant à un coefficient K_{OC} de 3,95 supérieur à celui du PCP au même pH (3,1)(d'après la figure II-5). Cette différence s'explique par le pK_A du TeCP (6), plus élevé que celui du PCP. Ainsi à un pH donné, la fraction de molécules neutres (AH/A_{tot}) sera plus élevée pour le TeCP que pour le PCP, conduisant à une fixation plus grande du premier. Pour la

même fraction de molécules neutres (à $\text{pH} = \text{pK}_A$), le pK_{OC} du PCP est de 4,1, soit un K_d de 132.

On peut donc s'attendre, en conditions naturelles en cas de dégradation du PCP, à une rétention très élevée des premiers produits de dégradations, il est donc peu probable au vu de ce résultat que nous puissions les détecter dans la solution du sol.

CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté les raisons qui nous ont conduit à choisir les différents sols utilisés ainsi que la molécule organique modèle : le PCP. Nous avons également décrit les principales caractéristiques physico-chimiques des sols et de la molécule organique.

Par ailleurs, nous avons étudié le comportement du PCP dans différents matériaux solides afin d'estimer les interactions solide-liquide existantes et d'identifier les mécanismes impliqués.

Au vu des résultats présentés, quelques hypothèses globales peuvent être émises quant au comportement possible du PCP dans le sol. Le PCP étant un acide faible, donc une molécule ionisable, son état moléculaire dans la solution du sol est directement lié à son pH. Cet état moléculaire régit l'intensité de la fixation par le sol. Le PCP est également une molécule très hydrophobe à cause de la présence des cinq atomes de chlore, il présente donc des interactions prépondérantes avec la matière organique des sols, dont le taux est directement relié au taux de fixation du PCP par l'intermédiaire du K_{OC} lui même lié au pH.

La possibilité d'interactions avec les argiles a été mise en évidence également, essentiellement avec la forme neutre du PCP. Elles peuvent entraîner jusqu'à 6% de disparition du PCP en solution à pH 5. Des interactions fortes peuvent également intervenir au contact des oxydes métalliques et en particulier de la forme ionisée par établissement de liaisons ioniques ou de coordination ou par liaisons hydrogènes.

Il existe donc de nombreux mécanismes d'interactions du PCP avec les sols, qui font que cette molécule sera rapidement et fortement retenu, on ne s'attend donc pas à ce que le PCP soit potentiellement dangereux pour les nappes phréatiques, d'autant plus que la vitesse moyenne

d'adsorption mesurée est relativement grande et que les vitesses de transfert hydrique dans les sols sont faibles (quelques cm par jour au plus) s'il n'y a pas d'écoulements préférentiels rapides dans la macroporosité (fissures, galeries...).

On peut donc dire, sur la base des résultats obtenus, que la vitesse d'adsorption du PCP est beaucoup plus grande que la vitesse potentielle de transport par l'eau dans le sol, ce qui est également la conclusion tirée par Jury et al. (1987) qui donnent un temps d'apparition du PCP à 3 m de profondeur de 145 ans ainsi que par Goerlitz et al (1985) qui n'observent pas de transport de PCP dans un sédiment lorsque le pH est égal à 6.

En se basant sur le facteur de retard présenté par le PCP par rapport au transport de l'eau calculé d'après la relation (paragraphe V-5-1) :

$$R = 1 + \frac{\rho K_d}{\theta}$$

ou ρ est la densité sèche apparente du sol (environ 1,3 pour le sol cultivé), θ la teneur en eau volumique du sol ($\cong 50\%$) et k_d le coefficient de distribution du PCP au pH du sol (5,9) soit $26,5 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$, il vient :

$$R = 1 + \frac{1,3.26,7}{0,5} = 70$$

On peut dire dans ce cas que le PCP sera transport  70 fois plus lentement que l'eau dans le sol, ce qui conduit à des vitesses de déplacement quasiment négligeables.

Il faut toutefois prendre ces observations globales avec réserve, car la notion de facteur de retard est basée sur l'hypothèse d'équilibre (en statique) qui peut être différent de celui obtenu en écoulement dans les sols en conditions naturelles, ce que nous étudierons dans le chapitre V.

CHAPITRE III

LES ASPECTS BIOLOGIQUES DU DEVENIR DES PRODUITS CHIMIQUES DANS LES SOLS : REVUE ET SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont montré que la biodégradation peut être la voie majeure ou partielle de disparition des produits chimiques dans les sols (Bollag & Liu 1990, Fournier 1989, Chakrabarty 1986, Alexander 1981). La prise en compte des aspects biotiques dans le devenir des produits chimiques est donc devenue indispensable pour obtenir une prédiction satisfaisante de ces phénomènes.

Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, le sol est un milieu hétérogène complexe plus ou moins structuré et conduisant à des comportements physico-chimiques également complexes. L'introduction de la composante biologique ne fera qu'amplifier cette hétérogénéité dans la mesure où des interactions réciproques vont intervenir entre les microorganismes et les constituants du sol (Bruckert 1979). Dans l'évaluation du rôle des microorganismes dans le devenir d'une molécule introduite il faudra prendre en compte la variabilité temporelle de la structure du sol et des populations microbiennes.

Le sol héberge une grande variété de microorganismes (virus, bactéries, champignons, algues, lichens, protozoaires), dont les bactéries présentent le plus grand nombre d'individus.

La dynamique des populations microbiennes dans les sols est régulée par des facteurs biotiques, comme la compétition et la prédation (Steinberg 1987, Recorbet 1993) et des facteurs abiotiques caractéristiques de chaque sol étudié tels que les flux de matière organique et les variations de température ou de teneur en eau (Hattori & Hattori 1976, 1988, Van Elsas et al. 1986, Richaume 1992).

Il apparaît ainsi que la dynamique des populations microbiennes et conséquemment leurs activités, (dont la biodégradation des composés organiques et xénobiotiques) dépendent de nombreux paramètres. La compréhension des mécanismes impliqués dans le fonctionnement biologique des sols est une étape nécessaire pour pouvoir évaluer

l'importance et la réalité des phénomènes de biodégradation et entreprendre des essais de remédiation *in situ*. Les essais ont été rarement efficaces jusqu'ici, faute d'avoir identifié et compris les mécanismes prépondérants impliqués dans ces défaillances.

La biodégradation des produits xénobiotiques peut être abordée par l'approche plus générale de la dégradation des produits organiques dans les sols (Jocteur-Monrozier et al. 1993). Les voies métaboliques dépendent alors non seulement des microorganismes présents, mais aussi de leur activité dans des conditions environnementales données.

Cela implique la détermination de certains paramètres importants comme la localisation des microorganismes dans les sols, leur activité, la dynamique des populations indigènes mais aussi les modifications génétiques entraînées par la présence des pesticides et conduisant à l'évolution génétique de ces populations par l'intermédiaire du phénomène d'adaptation.

Ces paramètres doivent alors être utilisés pour élaborer une modélisation mathématique représentant au mieux les différents mécanismes fondamentaux qui auront été identifiés.

III-1 Les microorganismes dans les sols

III-1-1 Nature des microorganismes

Les sols contiennent de nombreux microorganismes vivants pluri ou unicellulaires, comme les bactéries, les champignons, les algues, les virus, les lichens ou encore les protozoaires. Présentes en moyenne à 10^9 cellules par gramme de sol, les bactéries sont les organismes les plus nombreux dans les sols où elles sont représentées par plus de 200 genres différents (Paul & Clark 1989). Les fonges présentent en outre des capacités de dégradation des xénobiotiques plus élevées que celles des bactéries grâce à un spectre enzymatique beaucoup plus large (Bumpus & Aust 1987).

En plus des algues unicellulaires et des lichens (associations symbiotiques champignon-algue) on trouve une microfaune souvent très active et responsable des phénomènes de prédation vis à vis des bactéries donc impliquée dans la régulation des populations du sol (Barbault 1981, Steinberg 1987).

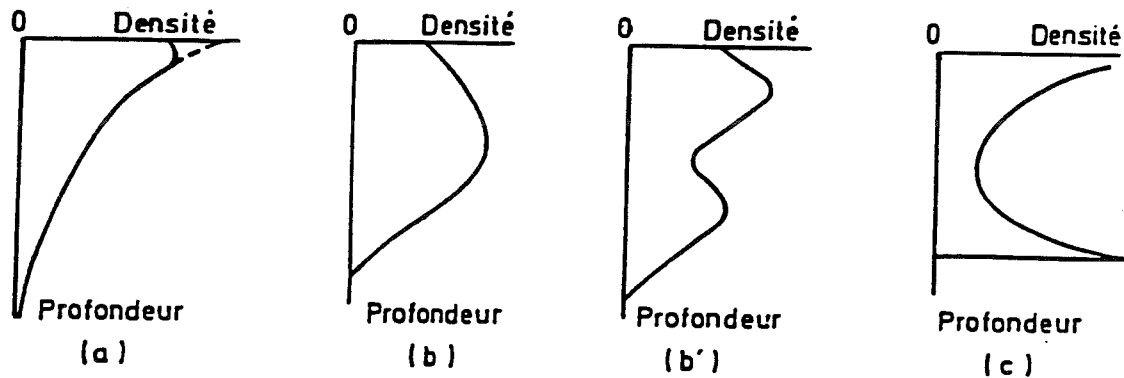
La plupart de ces microorganismes sont impliqués dans les processus de biodégradation des xénobiotiques soit directement (bactéries, champignons, algues) grâce à leurs capacités de dégradation, spécifiques ou non, soit indirectement (algues, microfaune) par la régulation du niveau des populations efficaces pour la dégradation par les phénomènes de prédation ou de compétition pour les substrats minéraux ou pour les niches écologiques (Steinberg et al. 1990).

III-1-2 Distribution verticale des microorganismes

Les microorganismes ne sont pas répartis uniformément dans les sols. Toutes les méthodes de mesure de l'abondance des microorganismes : MPN, CFU, microscopie à fluorescence, mesures d'ATP, de biomasse, de respiration (Ramsay & Bawden 1983, Tate & Jenkinson 1982, Jenkinson & Ladd 1981, Young & Burns 1993, Amato & Ladd 1988, Paul & Clark 1989), ont permis de montrer qu'ils sont plus abondants aux endroits où la matière organique fraîche est introduite, c'est à dire dans les litières et dans les horizons de surface (A) des sols (Domergues 1970) mais aussi au contact des racines, dans la rhizosphère (Youssef et al. 1989).

Bien que pouvant être présents à de très grandes profondeurs (Paul & Clark 1989), les microorganismes sont concentrés dans les premiers centimètres des sols (figure III-1) où se dérouleront préférentiellement les processus de biodégradation par la microflore indigène (Fournier et al. 1989).

De plus, ces microorganismes, par leur activité ou par la libération de produits spécifiques, aident à la formation de complexes organo-minéraux qui sont à l'origine de la structuration des sols (Dorioz et al. 1982, 1993, Bruckert 1979). La dégradation de la matière organique et des intrants organiques dans les sols par ces microorganismes entraîne des fluctuations de populations dépendantes également des conditions environnementales (Swift et al. 1979, Paul & Clark 1989).



a/ Type décroissant, b/ type convexe à 1 maximum,

b'/ type convexe à 2 maximums, c/ type concave

Figure III-1 : Les différents types de distribution verticale des microorganismes dans les sols (d'après Dommergues 1970)

III-1-3 Distribution microscopique

La distribution des microorganismes dans les sols n'est pas aléatoire, elle est dictée essentiellement par les relations trophiques existant entre les différents organismes (figure III-2) (Paul & Clark 1989) et par la disponibilité des divers substrats (Konings & Veldkamp 1983).

C'est ainsi que l'on retrouve 10^{10} à 10^{12} bactéries cm^{-3} au contact direct des racines actives ou dans les exsudats racinaires où les nutriments, solubles ou non, sont nombreux (acides aminés, acides aliphatiques et aromatiques, amides, hydrates de carbone simples ou

complexes, protéines...) (Foster 1988). Le nombre de microorganismes chute à quelques mm de ces surfaces comme le montre le tableau III-1.

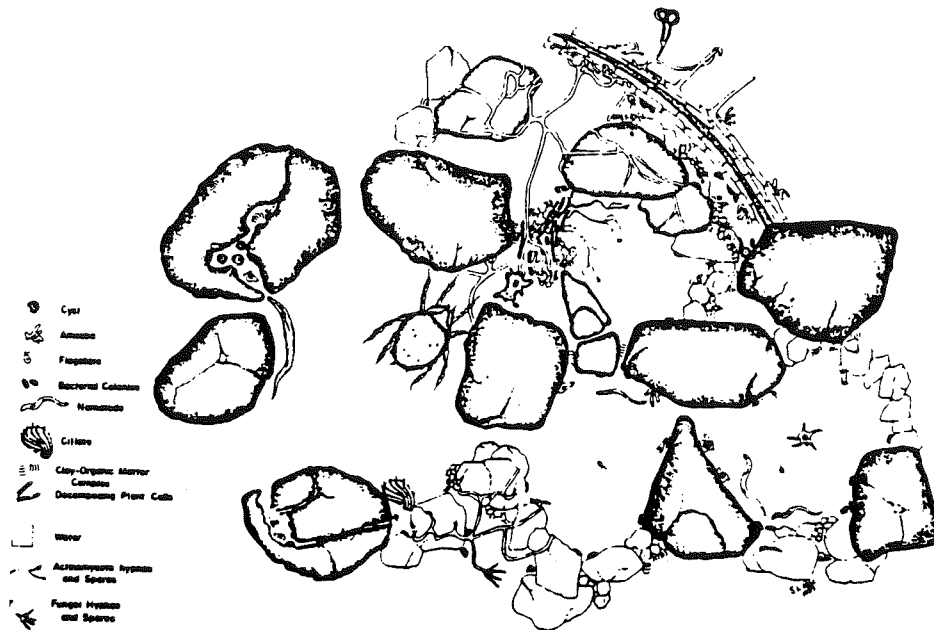


Figure III-2 : Distribution microscopique des microorganismes dans le sol
(d'après Paul & Clark 1989)

Cette caractéristique est très intéressante dans le cadre des processus de biodégradation dans la mesure où nous avons vu au chapitre précédent que la matière organique était un site privilégié d'interaction pour les molécules xénobiotiques, pouvant ainsi favoriser le contact microorganisme-polluant.

Eloignement de la surface de la racine (mm)	Nombre de microorganismes $10^9 \text{ cellules.cm}^{-3}$
0-1	120
1-5	96
5-10	41
10-15	34
15-20	13

Tableau III-1 : Densité des microorganismes en fonction de l'éloignement des racines (D'après Paul & Clark 1989).

La structuration des sols en agrégats, constitués eux même de microagrégats, et l'extraction incomplète des microorganismes des sols par des lavages à l'eau ont conduit certains auteurs (Hattori & Hattori 1976, 1988, Foster 1988, Kilbertus 1980) à suggérer l'existence de 2 microhabitats virtuels possibles pour les microorganismes : le compartiment interne (porosité interne) et le compartiment externe, dans la porosité externe de ces microagrégats (figure III-3).

Chacun de ces compartiments peut être assimilé à un environnement écologique très différent, le premier correspondant à un microhabitat presque fermé donc protégé, où les entrées et sorties de solutés (nutriments et gaz) se font presque exclusivement par l'intermédiaire de l'eau, et par diffusion.

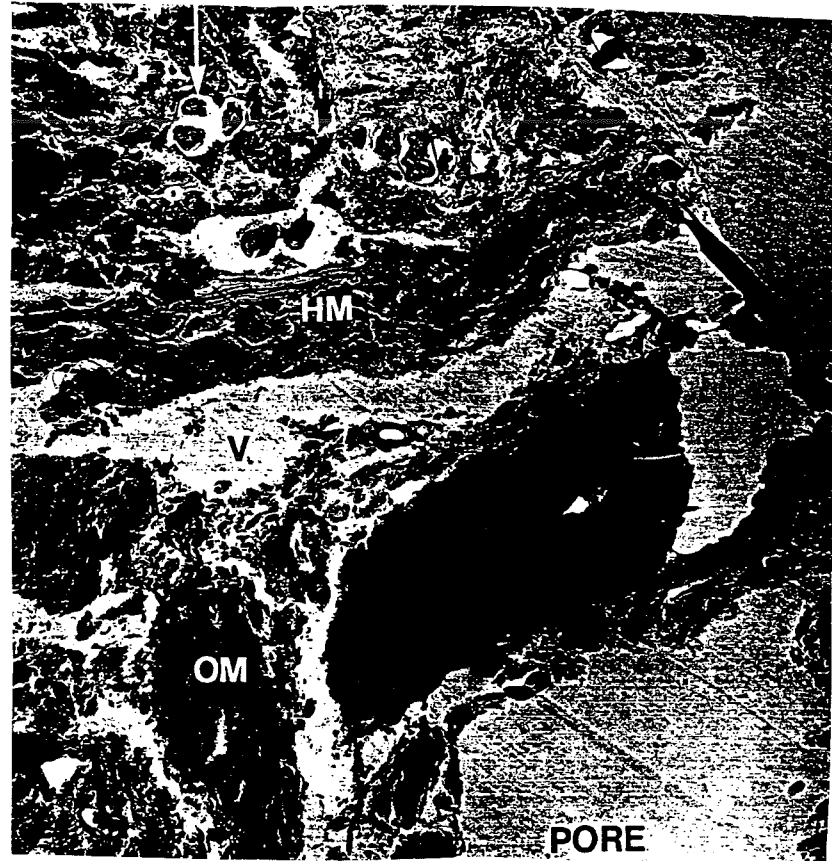


Figure III-3 : Mise en évidence de la double compartimentation des microorganismes dans le sol (d'après Foster et al., 1983)

Ce compartiment permet une protection des microorganismes contre la prédation et contre les stress extérieurs (dessiccation, toxines, antibiotiques...) (Foster 1988). Cependant, la survie dans ce compartiment nécessite également de nombreuses adaptations en raison de la relative

inaccessibilité des substrats conduisant souvent à un milieu anoxique où les activités microbiennes sont faibles. Les microorganismes sont alors en état de latence (Hattori 1988) mais toujours viables. Ainsi, des bactéries ont pu être conservées pendant plusieurs dizaines d'années dans des microagrégats desséchés (Paul & Clark 1989).

Le compartiment externe quant à lui, peut être assimilé à un microhabitat beaucoup plus ouvert aux autres compartiments du sol où s'effectuent en particulier les transferts hydriques et les échanges avec l'atmosphère du sol. La composition de ce compartiment est donc sujette à fluctuation conduisant notamment à des stress pour les microorganismes du sol. On y trouvera essentiellement les organismes de plus grande taille exclus des microagrégats et ceux capables de produire des formes de résistance (chlamydospores, endospores, sclérotes): champignons, protozoaires, métazoaires, mais aussi des bactéries qui auront acquis des mécanismes de résistance par exemple au stress hydrique (osmotolérantes) à l'anoxie (aérobies facultives) ou à la salinité (halophiles) (Brock 1984).

Cette double compartimentation a été surtout observée pour les bactéries à cause de leur petite taille (donc capables de coloniser les microagrégats). On a pu observer en particulier que les bactéries du compartiment interne étaient en majorité des bactéries à gram négatif (dépourvues de forme de résistance) alors que dans le compartiment externe on trouve plutôt des bactéries à gram positif (Hattori 1988).

Ce phénomène est dû essentiellement à la différence observée dans la structure pariétale de ces deux types de bactéries (figure III-4):

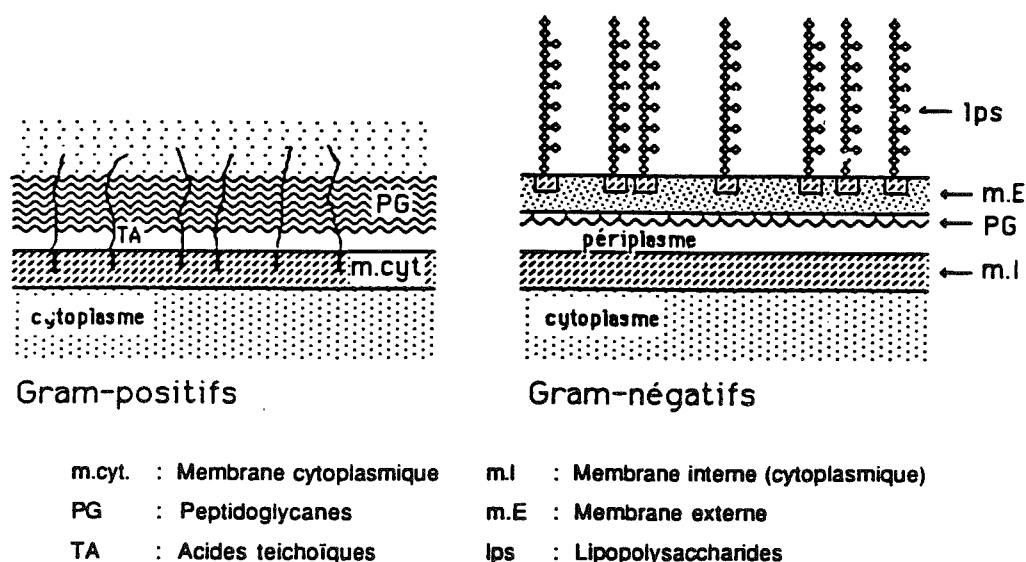


Figure III-4 : Représentation schématique de la structure pariétale des bactéries à gram négatif et positif (d'après Pelmont 1993).

La surface des bactéries à gram négatif est tapissée de lipopolysaccharides (LPS) connus pour leur capacité à fixer les particules minérales fines (Tisdall & Oades 1982, Dudman 1977, Chenu 1993) (figure III-5), par l'intermédiaire de cations métalliques, comme les argiles qui ont ainsi un effet protecteur vis à vis des stress climatiques (température, dessiccation) (Dommergues & Mangenot 1970, Heijnen et al. 1993). Ce mécanisme est en partie responsable de la formation des complexes organo-minéraux (figure I-1) qui sont à l'origine des microagrégats (Bruckert 1979).

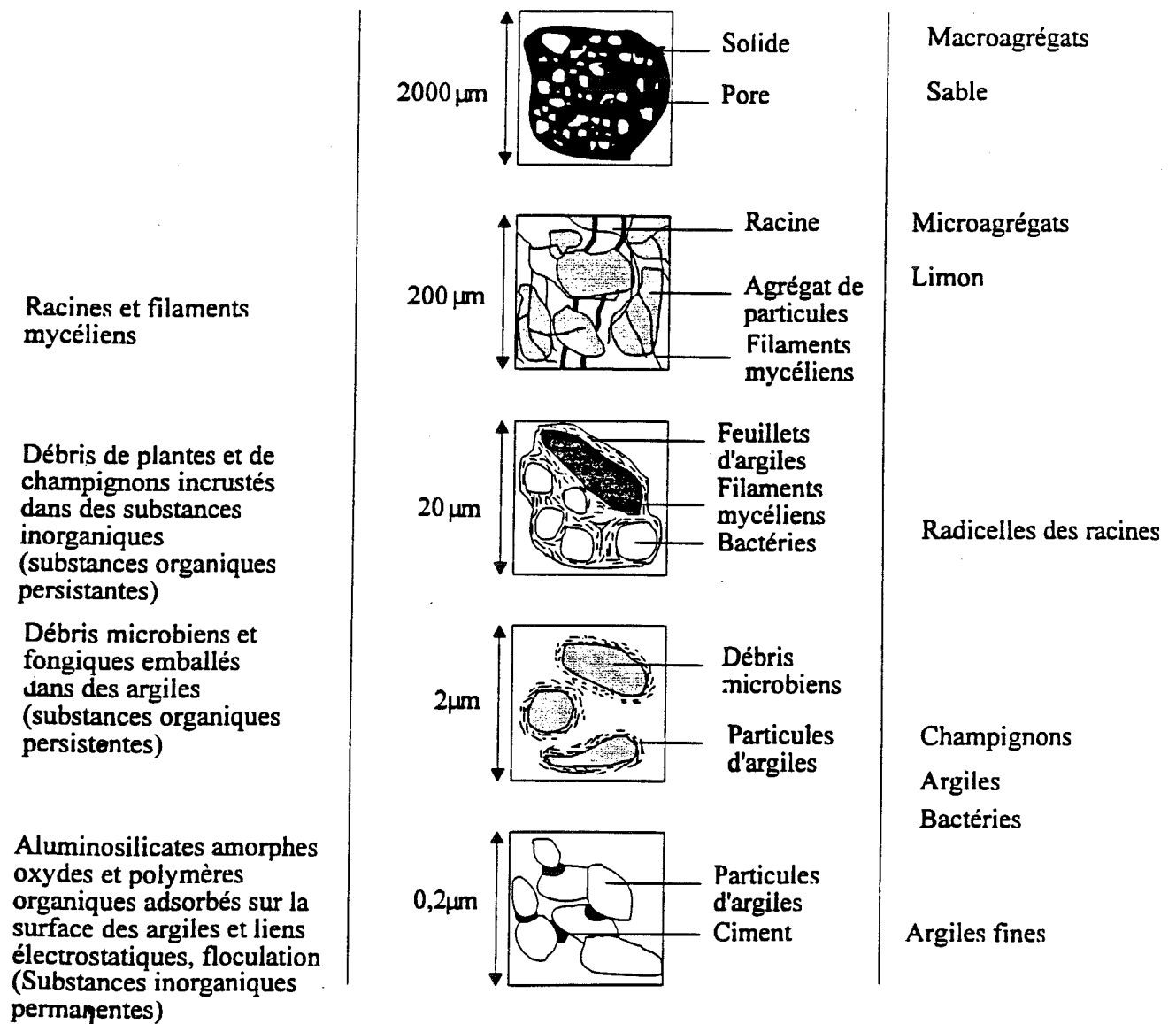


Figure III-5 : Modèle d'organisation d'un agrégat montrant les tailles relatives des constituants et les principaux agents de la liaison (d'après Tisdall & Oades 1982).

Le sol (au moins dans la rhizosphère) est un milieu constamment perturbé par les activités biologiques et on y observe des phénomènes de lessivage de particules minérales fines, des dynamiques de populations microbiennes, des croissances cellulaires et racinaires entraînant des mouvements microscopiques du sol. Ceci conduit à la formation de structures qui peuvent avoir des durées de vie inférieures à une journée.

Quelle que soit l'échelle d'observation, on voit toujours une organisation physique du sol : macrostructure ou microstructure. Cette structuration, influencée par la courbe granulométrique du sol, est à l'origine du réseau poral dont la taille varie à peu près comme celle des différentes particules solides (Smart 1975).

Hattori (1976) a estimé que le diamètre moyen des pores le plus favorable au développement des procaryotes est compris entre 2 et 6 μm , en se basant sur la taille et le volume moyen des bactéries ainsi que sur d'autres observations selon lesquelles les pores capables de retenir l'eau par capillarité (indispensable à la survie des microorganismes) ont une taille allant de 0,1 à 6 μm (Smart 1975). Le nombre de bactéries ainsi que certaines activités biochimiques (nitrification et respiration du soufre) augmentent lors de l'addition d'eau jusqu'à saturation des pores d'environ 6 μm puis se stabilisent (Hattori & Hattori 1976).

Kilbertus (1980) a confirmé ces hypothèses, en observant dans trois sols différents la présence de bactéries dans des pores dont la taille était comprise entre 0,8 et 10 μm avec une majorité de pores colonisés compris entre 0,8 et 3 μm (le maximum étant entre 1 et 2 μm).

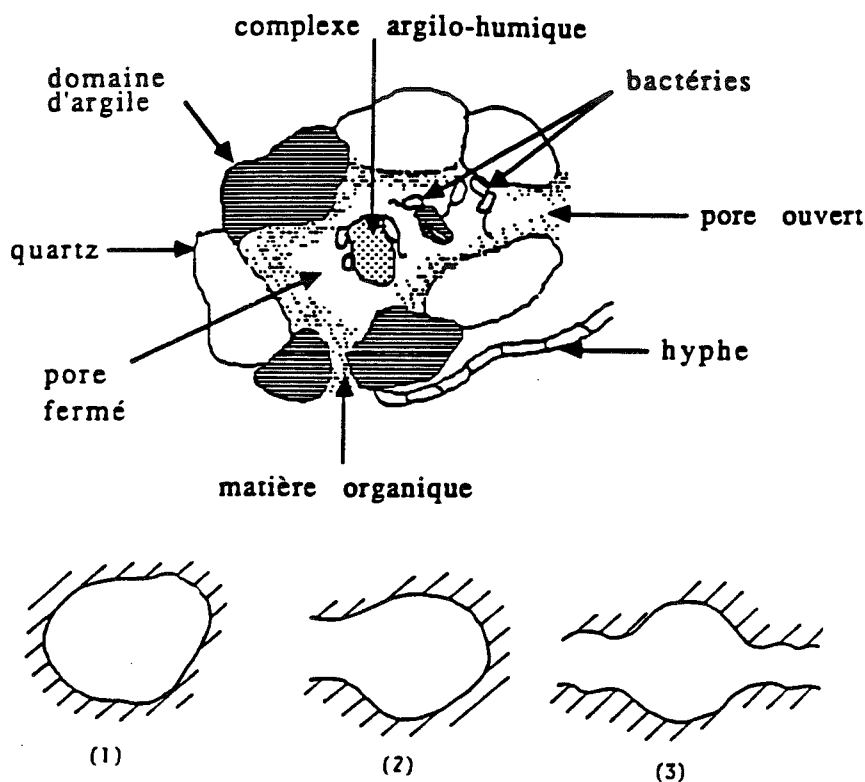
De plus, il a observé que le diamètre moyen des bactéries dans les différents sols étudiés était compris entre 0,6 et 0,75 μm donnant dans tous les cas un rapport diamètre moyen des bactéries/diamètre moyen des pores de 0,33.

Il semble donc que l'espace vital minimum nécessaire au développement d'un procaryote soit d'environ 0,8 μm^3 .

Les microhabitats que sont les pores, sont généralement classés en trois catégories selon leurs relations avec les espaces inter-agrégats (Hattori & Hattori 1976) : les pores fermés, avec une ouverture et avec plusieurs ouvertures (figure III-6).

Kilbertus (1980) a effectivement pu observer, en nombre, le premier type au sein des microagréats, et le deuxième type en périphérie, alors que les pores à plusieurs ouvertures semblent beaucoup plus rares.

L'influence de la structuration des sols et des complexes argilo-humiques sur la compartimentation des bactéries peut également être mise en évidence par la mesure de la distribution spécifique de la biomasse microbienne dans les différentes fractions granulométriques des sols (Jocteur Monrozier et al. 1993).



- (1) pore fermé
- (2) pore ouvert en cul-de-sac
- (3) pore cylindrique à double ouverture

Figure III-6 : Les divers types de pores rencontrés dans les sols
(d'après Hattori & Hattori 1976).

Il apparaît que pour des sols de texture similaire mais de structure différente, la distribution spécifique de la biomasse microbienne dans les différentes fractions granulométriques peut varier.

La figure III-7 montre la prédominance de microorganismes dans la fraction 2-20 μm (microagrégats) d'un sol argileux sous prairie (Vertisol A-1) alors que pour l'horizon Bt d'un autre sol argileux (Alfisol Bt) on retrouve 80% de la biomasse dans la fraction dispersable < 2 μm (compartiment externe) (Jocteur Monrozier et al. 1991).

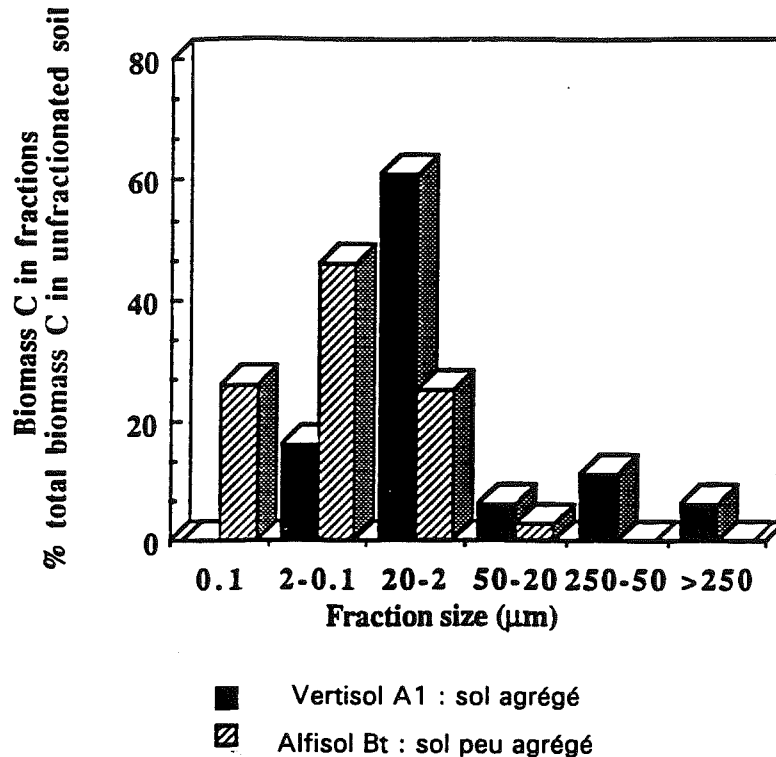


Figure III-7 : Distribution de la biomasse microbienne dans sols argileux de structuration différente (d'après Jocteur Monrozier et al. 1991).

III-1-4 Influence des microenvironnements et des facteurs abiotiques sur les activités microbiennes

La survie des microorganismes et leurs activités sont directement liées à la disponibilité des ressources et à certains facteurs abiotiques comme la température, la teneur en eau, la pression partielle en oxygène, le taux de matière organique, de CO₂ et d'argile ou encore le pH (Steinberg 1987, Richaume 1992, 1989, Harris 1981, Hattori & Hattori 1976).

III-1-4-1 le microenvironnement

L'influence des microenvironnements intervient essentiellement au niveau de l'état des cellules dans le milieu, en effet, les bactéries du sol sont toujours fixées sur des surfaces (Hattori & Hattori 1976) (figure III-8). Elle ne sont à l'état libre que temporairement lors de mouvements dans la phase liquide volontaires (présence de constituants particuliers : flagelles, pili) ou involontaires (mouvements browniens ou par convection dans l'eau du sol).

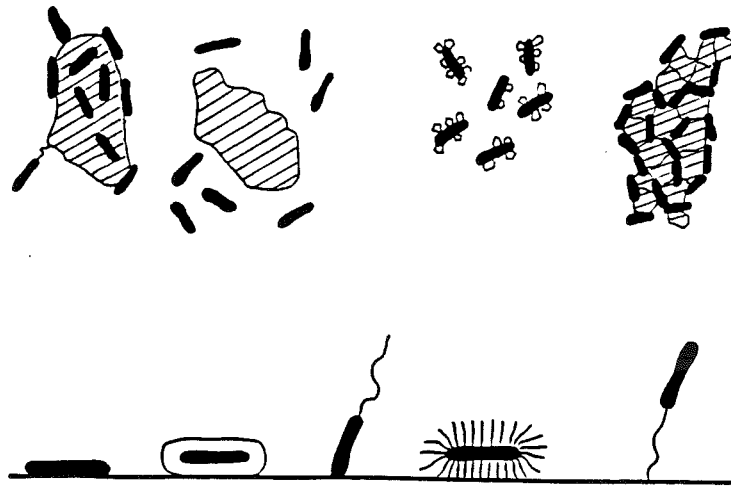


Figure III-8 : Les différents modes de fixation des bactéries
(d'après Hattori & Hattori 1976).

L'utilisation de mutants bactériens rendus non mobiles (Gammack et al. 1992) présentant le même taux de colonisation de racines que la bactérie non mutée a permis de montrer que les mouvements bactériens dans les sols étaient dus essentiellement aux effets hydriques bien que les résultats dans ce domaine soient contradictoires (Wilkinson et al. 1981, Soby 1983).

On peut cependant supposer que ces contradictions sont liées au potentiel hydrique et en particulier à la présence ou non d'eau de percolation (gravitaire), qui va déterminer le mécanisme prépondérant (Griffin 1981, Gammack et al. 1992).

Certains auteurs ont montré que le fait d'être fixées conférait aux bactéries certains avantages par rapport aux cellules libres et en particulier sur le taux de reproduction (Filip & Hattori 1984) ou sur les vitesses de certaines réactions enzymatiques du métabolisme (Hoppe 1984).

Dans des milieux de cultures liquides bien aérés, l'efficacité moyenne des bactéries pour la synthèse de biomasse à partir de glucose est de 60%. Cependant, il semble que certains processus comme l'adhésion des cellules (qui contribue à l'augmentation du potentiel osmotique entre les cellules et les surfaces, Marshall 1986) permettent d'accroître cette efficacité de biosynthèse.

Ceci serait dû apparemment à l'utilisation pour la biosynthèse de l'énergie formée grâce à ce potentiel osmotique (Gottschalk 1988). On s'attend donc à ce que des cellules libres aient un taux de biosynthèse plus faible que les cellules adsorbées donc un taux de respiration plus élevé (dégagement de CO₂) à partir de glucose.

Ceci a pu être observé par Jocteur Monrozier et al. (1993) en utilisant deux sols où la biomasse était distribuée différemment (figure III-9). On voit qu'une localisation majoritaire en position externe de la biomasse provoque un taux de respiration accru par rapport à une biomasse en position interne bien que la biomasse totale interne du sol agrégé soit nettement plus élevée que la biomasse du sol non agrégé.

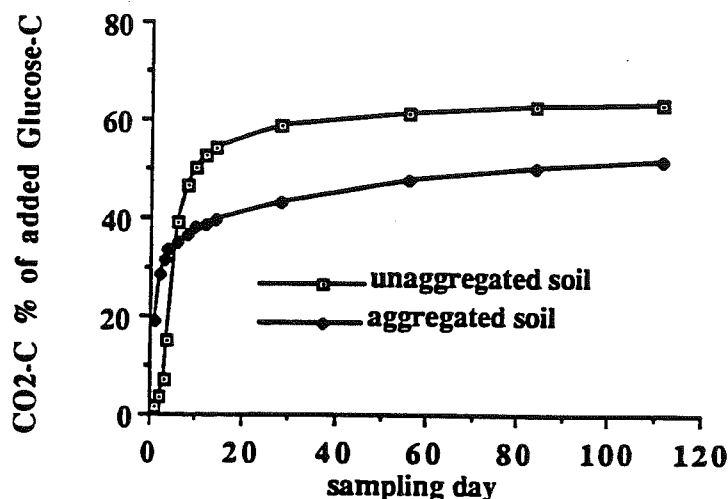


Figure III-9 : Cinétique de dégradation de glucose introduit dans deux sols ayant une distribution de biomasse microbienne différente (d'après Jocteur Monrozier et al. 1993)

III-1-4-2 Les paramètres hydriques

L'influence de l'eau sur la survie et les activités des microorganismes est généralement abordée selon deux aspects principaux : le potentiel énergétique de l'eau et ses mouvements.

Le potentiel hydrique correspondant à l'énergie avec laquelle l'eau est retenue dans le sol, ce potentiel peut s'écrire (Pappendick & Campbell 1981) :

$$\Psi = \Psi\pi + \Psi_m + \Psi_g - \Psi_p + \Psi\Omega$$

dans la plupart des cas, on peut négliger les trois dernier termes : Ψ_g qui correspond au potentiel gravitaire, Ψ_p qui représente le potentiel de pression lié à la charge hydraulique (H) et $\Psi\Omega$ le potentiel de surcharge (dans le cas de milieux poreux non rigides). On ne considère alors que $\Psi\pi$ qui correspond au potentiel osmotique de l'eau (en rapport avec la concentration en solutés) et Ψ_m : le potentiel matriciel dû aux effets capillaires et d'adsorption par la phase solide.

Dans la pratique, on utilise plutôt la notion de pF qui correspond à $\log \Psi$ exprimé en cm d'eau ($pF3 = 1 \text{ atm}$) et donne une bonne idée de l'état énergétique de l'eau dans le sol (figure III-10).

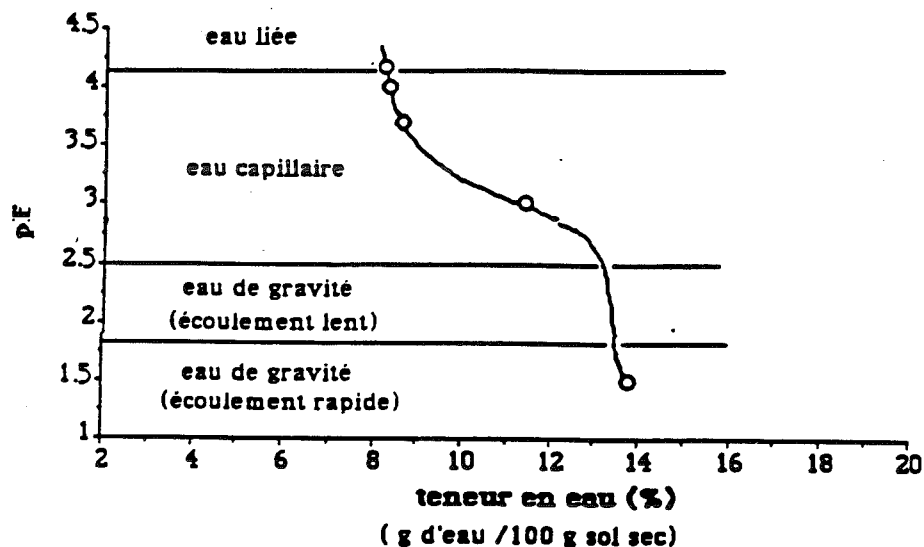


Figure III-10 : Les différents états de l'eau du sol en fonction du potentiel hydrique (d'après Richaumé 1992).

Les microorganismes, qui ont besoin de l'eau pour leur métabolisme sont capables de la désorber même à des potentiels très élevés (Harris 1981).

Les mouvements d'eau (liés au potentiel hydrique) sont importants du fait qu'ils sont à l'origine du transfert des substrats dissous (nutriments et gaz) dans les agrégats du sol. Ceux ci interviendront surtout lorsque le potentiel hydrique est élevé (eau peu retenue).

L'état énergétique de l'eau influe sur de nombreux paramètres et en particulier sur la diffusion moléculaire des solutés de l'eau du sol (figure III-11) (Pappendick & Campbell 1981, Griffin 1981) qui peut être

très fortement réduite, entraînant alors la limitation du développement des microorganismes.

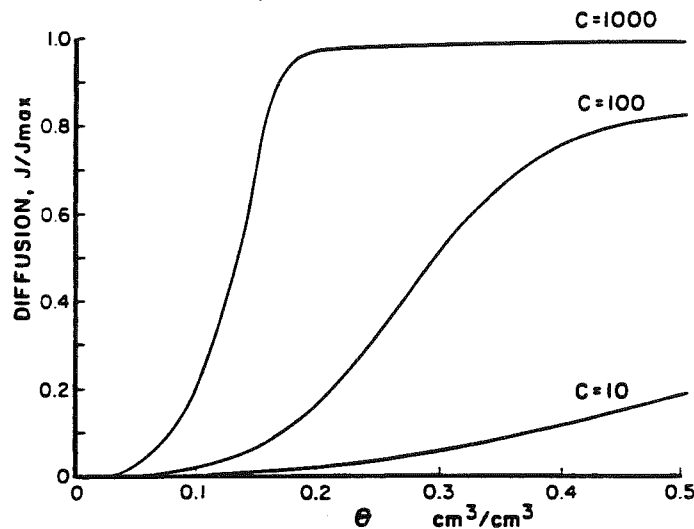


Figure III-11 : Influence de la teneur en eau sur la diffusion à 3 concentrations en solutés différentes : 10, 100 et 1000 mg/kg (d'après Pappendick & Campbell 1981)

Directement lié à la teneur en eau, l'état énergétique de l'eau est en relation directe avec la teneur en air du sol. L'eau influence donc le renouvellement de l'oxygène, source principale d'accepteur d'électron pour la majorité des microorganismes du sol. Ceci peut expliquer les nombreuses observations faites quant à la modification des activités microbiennes dans les sols en fonction de la teneur en eau (Griffin 1981, Harris 1981, Brock 1984, Grundmann 1988).

Des substituts à l'accepteur d'O₂ peuvent être trouvés par les microorganismes, en particulier les nitrates, le fer, les sulfates, mais aussi les cycles aromatiques hydroxylés ou chlorés qui peuvent être utilisés en priorité pour remplacer l'oxygène (Zehnder 1992).

Une des conséquences les plus connues et désastreuses du point de vue de l'écologie microbienne est l'augmentation de la sensibilité de certaines plantes d'intérêt agronomique à l'infection par des microorganismes pathogènes lors de la baisse de la teneur en eau. Il semble que cet effet soit dû à l'action dépressive de la teneur en eau sur la diffusion. En effet, ces plantes possèdent des systèmes de défense basés sur la production au niveau des racines de molécules antagonistes de ces microorganismes qui doivent atteindre leur cible par diffusion. La

diminution de la diffusion causée par la baisse de la teneur en eau réduit alors l'efficacité de ce mécanisme de défense (Griffin 1981).

La modification quantitative et qualitative des populations microbiennes au cours de la diminution de teneur en eau du sol est directement liée à la capacité de ces populations à extraire l'eau retenue dans les pores très fin ou à la quantité d'air disponible. Les populations fongiques, aérobies strictes, vont augmenter avec la baisse de la teneur en eau, à laquelle elles pourront résister pour certaines jusqu'à des valeurs correspondant à des potentiels hydriques de l'ordre de -500 bars (Brock 1984).

Cependant les bactéries n'ont pas les mêmes capacités de résistance à la dessiccation que les champignons (Paul & Clark 1989). On a pu constater en particulier que les "nitrifiants" (*Nitrosomonas*) étaient moins résistants au stress hydrique que les "ammonifiants" (*Clostridium*, *Penicillium*), ce qui peut conduire à une accumulation d'ammonium dans les sols à des teneurs en eau faibles (Paul & Clark 1989).

On a pu observer également (Bottner 1985, Van Gestel et al. 1993) que des variations drastiques de teneur en eau pouvaient entraîner lors de la réhumidification une augmentation de la respiration et de la biomasse du sol. Ceci est dû, semble-t-il, à l'utilisation de substrats libérés par les cellules tuées lors du dessèchement du sol.

III-1-4-3 Effet du pH

Bien que confrontés à des pH très variables, les cellules microbiennes ont des pH internes très constants et proches de la neutralité, grâce à des mécanismes de régulation souvent très complexes et issus d'adaptations physiologiques lentes.

Ces mécanismes sont souvent de gros consommateurs d'énergie. Cependant dans certains cas, surtout pour les bactéries, ils peuvent permettre de produire de l'énergie sous forme d'ATP grâce à la force proton-motrice responsable également de l'entrée dans les cellules de substrats dissous (Konings & Veldkamp 1983).

Tout comme pour le stress hydrique, il semble que les champignons soient capables de résister à des pH beaucoup plus faibles que les

bactéries. On trouve des champignons encore actifs à $\text{pH}=0$ alors que la majorité des bactéries ne résiste pas à des pH inférieurs à 4 (Brock 1984).

La majorité des facteurs abiotiques susceptibles d'influencer les activités microbiennes sont sous la dépendance, au moins partielle, des états de l'eau du sol. Ainsi le pH de la solution, tout comme celui des surfaces minérales, dépend de la concentration en proton et en ions hydroxydes. Ces concentrations varient avec le volume d'eau présent.

D'une manière générale, on peut dire que le pH des surfaces minérales est plus faible que celui de la solution du sol, ce qui s'explique par la charge négative de la majorité des surfaces provoquant alors la forte polarisation des molécules d'eau directement en contact avec ces surfaces conduisant à une densité de protons élevée. C'est la théorie de la double couche ionique (Stumm 1992, Paul & Clark 1989, Boyd & Mortland 1990).

Le sol étant par définition un milieu hétérogène, on trouvera localement des pH très variables alors que dans la pratique on a accès seulement au pH global de la solution du sol (pH eau), ou au mieux à une estimation de la valeur minimum due aux charges variables (pH KCl).

L'hétérogénéité du sol s'observe également au niveau biologique, et en particulier au niveau des microagrégats, ainsi Hattori (1993) a montré l'extrême variabilité quantitative des organismes vivants dans les microagrégats d'un même sol et comment ces populations pouvaient être affectées par des variations de teneur en eau.

Ceci avait déjà été largement observé à l'échelle de la rhizosphère où le nombre de microorganismes est très lié à la présence de matériel végétal et de matière organique (Youssef et al. 1989, Rasolomanana & Balandreau 1987, Vogel comm.perso).

Les activités liées au cycle de l'azote et en particulier l'ammonification sont souvent responsables de pH élevés dans les agrégats du sol. Ceux ci peuvent contraster avec des pH acides dans la solution du sol (Jocteur Monrozier 1984, Paul & Clark 1989). Ceci peut être une explication à certaines observations effectuées en laboratoire où la nitrification n'intervient pas en dessous de pH 6 alors que dans certains sols de forêt, on peut observer la nitrification à des pH inférieurs à 4. La présence dans ces sols de nitrifiants hétérotrophes acide-tolérants est également une explication possible (Paul & Clark 1989).

Le pH du sol est par ailleurs largement influencé par les activités biologiques, productrices de métabolites influençant la concentration en protons ou consommatrices des éléments influençant le pH.

C'est le cas en particulier de la respiration qui entraîne la libération de CO₂, de métabolites acides ou encore de nitrates, de sulfures ou de chlorures lors de la déshalogénation des xénobiotiques.

Ces activités sont elles mêmes dépendantes du pH, et en particulier la nitrification, à cause du fait que les enzymes possèdent un pH optimum d'activité, qui peut varier avec l'état de l'enzyme : libre ou fixée sur une surface (figure III-12). L'effet positif ou négatif sur le pH optimum dépend de la charge de la surface minérale, ceci est observé en particulier avec les exoenzymes (Coulet 1989, Boyd & Mortland 1990).

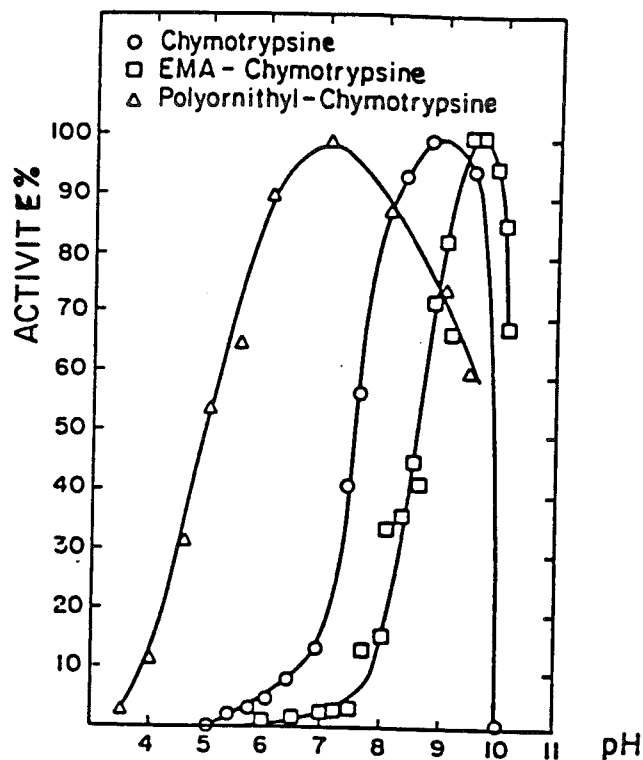


Figure III-12 : Effet de l'adsorption de la chimotrypsine sur son pH optimum (d'après Coulet 1989).

III-1-4-4 Le potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel rédox du sol est un paramètre très important dans la mesure où il influe directement sur les réactions d'oxydo-réduction

intervenant dans les processus chimiques et biologiques (Paul & Clark 1989). Du point de vue chimique, la mesure du potentiel rédox indique si une réaction est thermodynamiquement possible, bien que la présence dans les sols de catalyseurs comme les surfaces argileuses permettent souvent des réactions normalement très lentes.

Les réactions d'oxydoréduction sont à l'origine de la vie dans la nature puisque c'est le moyen pour les organismes vivants d'obtenir de l'énergie à partir de substrats réduits. L'obtention d'énergie s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs étapes d'oxydation au contact de transporteurs d'électrons situés, dans le cas des bactéries, dans la membrane cytoplasmique (figure III-13) (Konings & Veldkamp 1983, Paul & Clark 1989) :

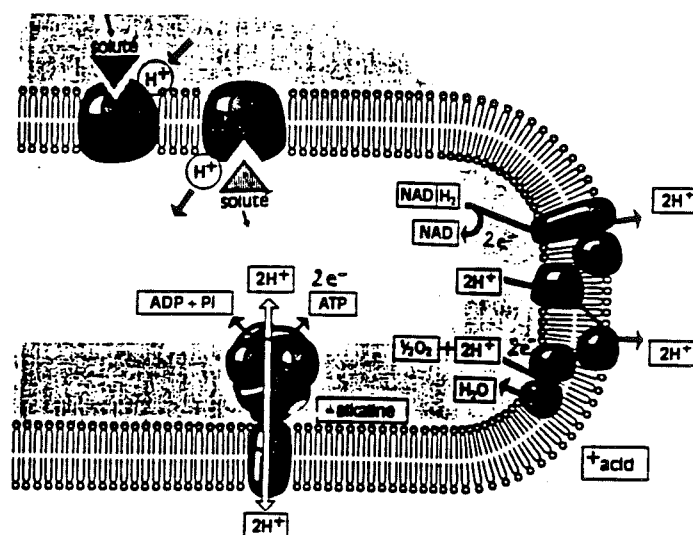


Figure III-13 : Le système de transporteurs d'électrons des bactéries (d'après Konings & Veldkamp 1983).

Comme on peut le voir sur cette figure, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène pour les organismes aérobies. Dans le cas de microorganismes anaérobies on trouve des accepteurs finaux comme NO_3^- , Fe^{3+} , Mn^{4+} , SO_4^{2-} et surtout C-Cl (Zehnder, 1992).

On remarque également que l'orientation du système de transporteur d'électrons est asymétrique, ce qui conduit à l'excrétion de proton à l'extérieur de la cellule (acidification) et à l'alcalinisation du cytoplasme cellulaire par l'accumulation d' OH^- . Un gradient de charge est ainsi créé,

qui va servir à des transports actifs, à la mobilité des cellules ou à la synthèse d'ATP (Paul & Clark 1989).

On voit donc que l'aération du sol (liée à la teneur en eau) et en particulier la pression en oxygène peut influencer fortement les activités microbiennes en favorisant le développement de populations soient aérobies, soient anaérobies. Harris (1981) a montré que ce changement de métabolisme intervient lorsque la concentration en O_2 descend au dessous de 1% dans l'atmosphère du sol.

C'est un des processus majeur influant sur la dégradation des pesticides organo-halogénés puisque de nombreux auteurs ont observé que les réactions de déshalogénation étaient fortement favorisées en conditions anaérobies (saturation en eau), c'est à dire en milieu réducteur (Vogel et al. 1987, Fathepure & Vogel 1991, Chakrabarty 1986, Deweerd & Suflita 1990, Mohn & Tiedje 1992).

De plus, on a pu constater que la détoxification par voie biologique de métaux lourds (comme le manganèse) accumulés dans l'environnement est largement dépendante du potentiel rédox du milieu, celui-ci influant sur la forme chimique des métaux : réduits ou oxydés donc solubles ou non (Di Ruggiero 1989).

III-1-4-5 La température

La température, comme nous avons pu le voir dans le chapitre I, affecte la plupart des caractéristiques physico-chimiques du sol et en particulier la diffusion, les interactions avec les surfaces, la viscosité, mais aussi les mouvements browniens, la tension superficielle de l'eau ainsi que son état physique (Paul & Clark 1989).

On s'attend donc à ce que la température directement ou par l'intermédiaire de ces paramètres, affecte les activités et la survie des microorganismes dans les sols (Brock 1984).

On observe ainsi une courbe d'activité en fonction de la température typique pour les microorganismes (figure III-14) avec une température optimale variable suivant le type d'organisme (adaptation) et des chutes d'activités plus ou moins rapides en dehors de cet intervalle de température.

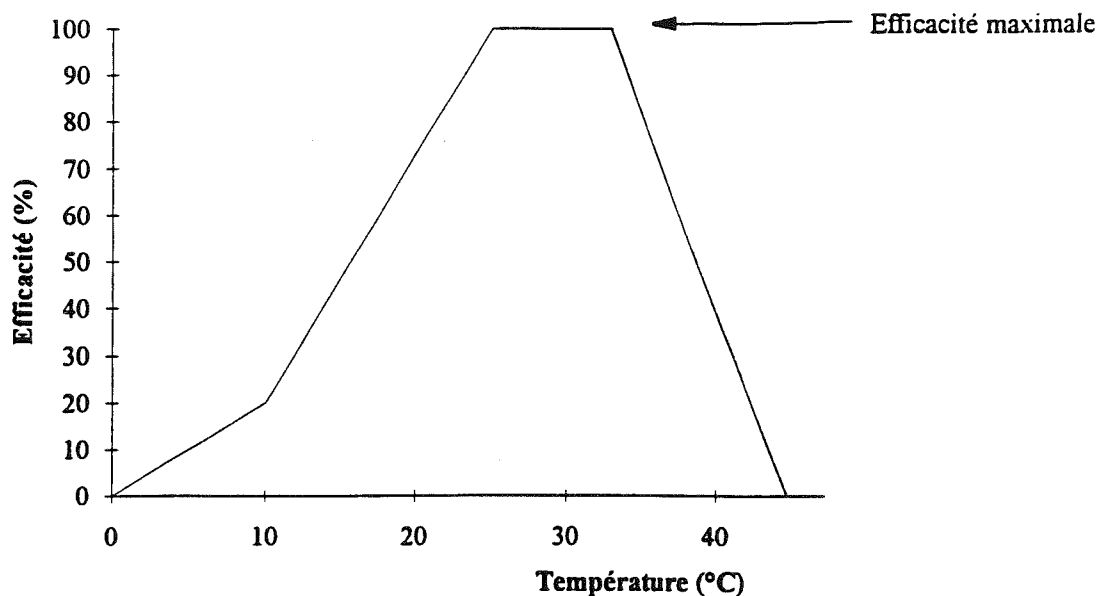


Figure III-14 : Effet de la température sur l'activité microbienne générale (d'après Paul & Clark 1989).

CONCLUSION

Les microorganismes, et en particulier les bactéries, existant depuis plusieurs millions d'années, ont eu la possibilité de développer au cours du temps des systèmes plus ou moins sophistiqués qui leur ont permis de s'adapter à la majorité des stress rencontrés dans l'environnement (tableau III-2).

L'apparition récente des molécules xénobiotiques dans le monde microbien peut être considérée dans certains cas comme un stress susceptible de perturber les activités et la survie de ces microorganismes.

On peut s'attendre à ce que ceux ci développent des systèmes de résistance et de détoxification.

Les molécules récalcitrantes sont en effet relativement peu nombreuses et ce sont surtout des structures aromatiques halogénées, mono ou polymères, (Alexander 1981, Chakrabarty et al. 1989, Pelmont 1993).

Stress	Effet sur les cellules	organismes impliqués	adaptations physiologiques et biochimiques
Chaud	Dénaturations enzymatiques	thermophile	synthèse de protéines thermostables
Froid	baisse de la fluidité membranaire	psychrophiles	production d'acides gras plus insaturés
potentiel hydrique	déshydratation et inhibition des activités enzymatiques	osmophiles halophiles xérophiles	compensation, exclusion de soluté adaptations enzymatiques
pH	dénaturation des protéines	acidophiles	exclusion de protons adaptation des appendices de surface
Potentiel redox	Altération des voies métaboliques	anaérobies microaérophiles	utilisation de sources d'électrons autres que O ₂ , fermentations

Tableau III-2 : Principales adaptations des microorganismes aux stress environnementaux (adapté de Paul & Clark 1989).

III-1-5 Devenir des populations introduites dans les sols

L'utilisation croissante de produits chimiques de synthèse pour toutes sortes d'applications a conduit à l'apparition dans l'environnement de nombreuses pollutions diffuses ou accidentelles entraînant des déséquilibres écologiques importants notamment dans les sites industriels ou les sols de culture. La prise de conscience de l'énorme potentiel que constituent les microorganismes, couplée au coût financier élevé des techniques physiques ou chimiques de dépollution des sols (Alexander 1977, 1981, Chakrabarty 1986) a permis le développement ou l'amélioration de nombreuses techniques de bioremédiation (épuration des eaux usées, épuration de sols contaminés, traitement de déchets

industriels...). Une des principales voies de recherche actuelle concerne l'introduction de populations microbiennes génétiquement ou physiologiquement adaptées directement dans des sols contaminés.

L'introduction de populations bactériennes dans les sols est une pratique relativement ancienne, employée en agronomie pour l'amélioration des rendements culturels. Les plus répandues sont les introductions d'organismes symbiotiques fixateurs d'azote appartenant en particulier aux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* et plus récemment dans le domaine de la lutte biologique (Weller 1988), les introductions pour éviter des contaminations végétales par des organismes phytopathogènes (*Agrobacterium*).

Relativement peu d'études présentant des résultats de bioremédiation positifs au laboratoire comme au champ sont disponibles dans la littérature (Salkinoja Salonen et al. 1989, Thomas & Ward 1989, Edgehill & Finn 1983). Les échecs observés assez régulièrement dans ce domaine mais aussi quelques fois dans le domaine agronomique (Thies et al. 1991) s'expliquent par le manque de connaissances fondamentales sur le comportement et la survie de populations introduites ou réintroduites dans les sols.

Des études fondamentales de plus en plus nombreuses se sont cependant développées ces dernières années dans ce domaine (Steinberg 1987, Richaume 1992, Recorbet 1993, Henschke & Schmidt 1989, Van Elsas 1986, 1991, Van Veen & Van Elsas 1986, Ramirez & Alexander 1980) qui ont permis d'établir en particulier les principaux facteurs impliqués dans la survie et l'activité des microorganismes dans le sol.

On s'est aperçu ainsi que les populations microbiennes introduites dans les sols se stabilisent à un certain niveau correspondant à la capacité biotique du sol qui dépend essentiellement de facteurs tels que la régulation par la compétition inter ou intraspécifique ou par la prédation (Barbault 1981, Steinberg 1987, Recorbet 1993, Acea et al. 1988).

Certains facteurs abiotiques sont également influents, tels que la teneur en eau, les ressources en nutriments, le pH ou la température (Richaume 1992, Duchaufour 1991, Stotzky 1974, Worrall & Roughley 1991).

Le niveau de population dépend aussi de la présence d'une rhizosphère (Thompson et al. 1990, Weller 1988), du mouvement des

microorganismes (Wilkinson et al. 1981, Madsen & Alexander 1982), ou de l'inoculum (Postma et al. 1990).

Il apparaît ainsi que le niveau de population est caractéristique d'un couple sol-microorganisme et ne peut en aucun cas être généralisé.

Van Elsas (1991) a montré que le transport d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* introduite dans une colonne de sol était relativement peu différent dans un sol remanié ou non remanié, mais qu'une teneur en eau élevée ainsi qu'une faible densité sèche apparente favorisaient le transport des bactéries qui pouvaient atteindre 50 cm.

Madsen (1982) a également observé l'effet positif de l'eau sur le transport vertical de *Bradyrhizobium japonicum* et de *Pseudomonas putida* dans un sol, cependant il n'a pas retrouvé de cellules au delà d'une profondeur de 2,7 cm si aucun agent externe n'était présent : Lombrics ou racines en croissance.

Worall & Roughley (1991) ont étudié le mouvement vertical d'une souche mobile de *Rhizobium leguminosarum* Bv. *trifolii*, ils ont montré en particulier que cette bactérie ne se déplaçait pas en dessous d'un potentiel hydrique de -8,9 kPa, alors que dans un sol saturé, ils observaient une migration rapide jusqu'à 15 cm aussi bien dans un sable que dans un sol limono-argileux.

Richaume (1992) a montré récemment que des microorganismes (*Pseudomonas aeruginosa*) introduits dans un sol stérile ou non, se retrouvaient localisés, après 30 jours, à 99% dans la fraction dispersable ($< 2 \mu\text{m}$), c'est à dire dans le compartiment externe des agrégats (figure III-15).

Cependant, jusqu'à 10^6 cellule.g⁻¹ étaient présentes dans la fraction 2-20 μm , montrant ainsi qu'une population introduite dans un sol est capable de coloniser le compartiment intra agrégat.

Ceci avait déjà été observé par Steinberg (1987) avec une souche de *Bradyrhizobium japonicum* mais à un taux moindre. Osawa et Yamagushi (1986) ont montré que la colonisation du compartiment interne est fonction du temps d'incubation.

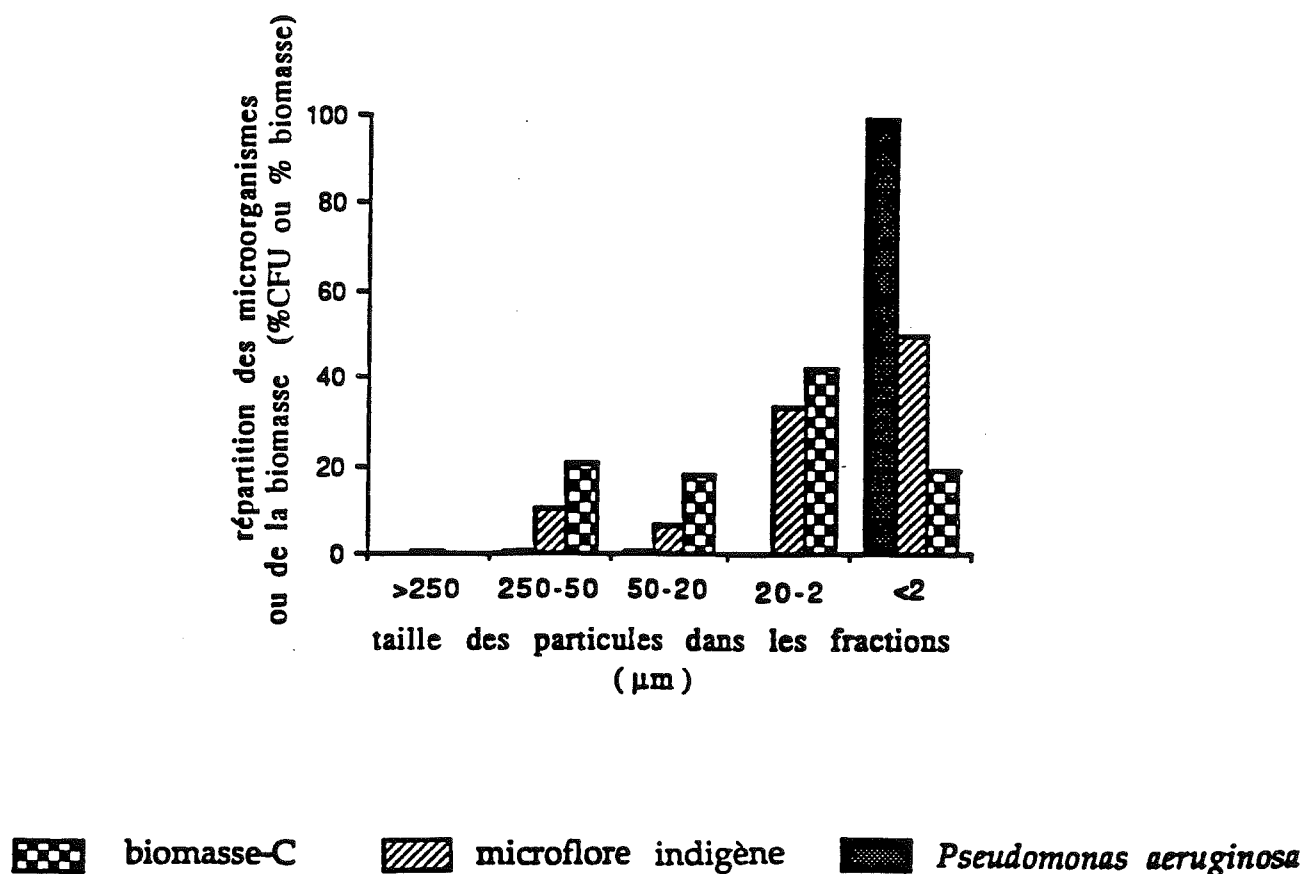


Figure III-15 : Localisation d'une population bactérienne 30 jours après inoculation (d'après Richaume 1992)

En dehors de la survie et de la dispersion de cellules introduites dans les sols, leur activité biochimique (biodégradation) ou génétique (transfert de gènes) a été étudiée.

Ainsi de nombreux auteurs ont pu montrer l'existence dans les sols de transferts de gènes horizontaux ou verticaux (Richaume 1992, Davey & Reaney 1980, Henschke & Schmidt 1989) et la stabilité dans le temps de certaines capacités de biodégradation (plasmidiques ou non) (Ramos et al. 1991, Mc Clure et al. 1991, Middeldorp 1990, Henschke & Schmidt 1989).

Dans la plupart de ces études, les caractères étudiés étaient stables sur des périodes relativement longues, en conditions de laboratoire. Très peu d'études effectuées en conditions de terrain sont disponibles jusqu'à présent (Salkinoja Salonen et al. 1989, Edgehill & Finn 1983).

III-2 Les processus de biodégradation

Les microorganismes et en particulier les bactéries étant présents dans tous les sols et à des taux souvent élevés, représentent la voie majeure de dégradation des composés organiques issus des débris végétaux. Les composés xénobiotiques étant pour la plupart des molécules organiques, il n'est pas étonnant de constater que les microorganismes peuvent avoir un effet supérieur aux processus physico-chimiques sur leur devenir (Munneke et al. 1982). Grâce à la grande diversité de voies métaboliques acquises au cours de leur évolution, les microorganismes, représentent la principale composante des processus biologiques.

La plupart des processus de biodégradation se développent spontanément dans le sol, cependant certains nécessitent une phase préalable d'adaptation à la transformation de ces différents produits, c'est en particulier le cas du catabolisme spécifique qui représente le phénomène le plus intéressant puisqu'il conduit le plus souvent à la minéralisation complète du produit pesticide.

III-2-1 Le phénomène d'adaptation à la dégradation des xénobiotiques

Le phénomène d'adaptation peut être défini comme les changements intervenant à la suite d'une perturbation et visant à rétablir un nouvel équilibre dans la communauté microbienne.

Dans le cas de l'introduction de xénobiotique, cela conduit à une augmentation du taux de dégradation à la suite de la mise en contact du composé xénobiotique avec les microorganismes du sol (Spain 1983). Ce phénomène a d'abord été décrit par Audus (1949), qui a observé l'adaptation d'un sol à la dégradation du 2,4 D représentée par une durée de vie raccourcie de ce produit dans le sol.

III-2-1-1 Les mécanismes de l'adaptation

Spain (1990) propose trois types d'adaptations possibles pour la biodégradation des pesticides, correspondant à la phase de latence observée avant la phase de dégradation (figure III-16) :

- Les microorganismes dégradants le produit sont présents dans le sol mais à un taux de population faible, qui va augmenter progressivement jusqu'à un niveau suffisant pour provoquer une disparition significative du produit.

- Les microorganismes sont présents mais les enzymes impliquées dans la dégradation doivent être synthétisées ce qui conduit à une phase de latence plus longue que la précédente.

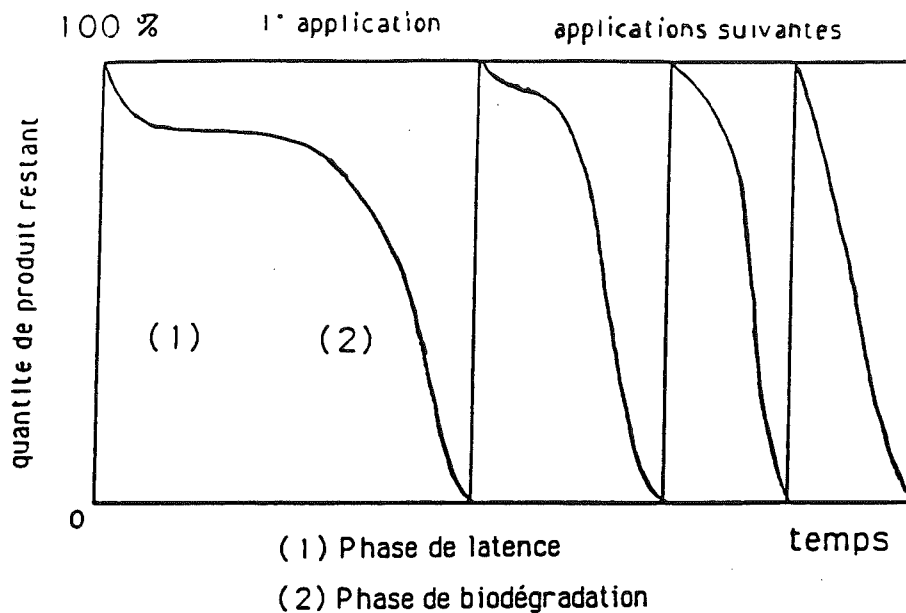


Figure III-16 : Mise en évidence du phénomène d'adaptation dans les sols.

- En plus des phénomènes précédents, une adaptation génétique est nécessaire, elle se caractérise par le transfert des gènes codant pour les enzymes responsables de la dégradation entre diverses populations microbiennes ou par l'acquisition de nouvelles capacités par l'intermédiaire de mutations et conduisant à une phase de latence souvent très longue en milieu naturel.

Dans le cas d'une base génétique du phénomène d'adaptation, le processus d'évolution des microorganismes correspondrait soit à des modifications de voies métaboliques préexistantes, par mutations ou recombinaisons, soit à l'apparition de nouvelles voies cataboliques codées par des gènes portés par des fragments d'ADN nouvellement acquis par les bactéries : le plus souvent des plasmides (Moormann 1990, Kearney & Kellog 1985, Van der Meer et al. 1992).

Ces modifications génétiques entraînent donc des modifications physiologiques permettant aux microorganismes de s'adapter à l'utilisation

des polluants. En particulier, cette adaptation se ferait soit par une modification des spécificités enzymatiques, soit par l'altération du fonctionnement des membranes bactériennes, soit encore par la synthèse d'éléments cellulaires nouveaux permettant la détoxification ou le métabolisme des polluants (enzymes, chélatants...) (Kearney & Kellog 1985, Van der Meer et al. 1992).

L'adaptation des microorganismes est souvent dépendante de nombreux facteurs comme la concentration en pesticide, le temps d'exposition, l'inoculum, la structure chimique du polluant ou encore les conditions environnementales (aération, teneur en eau, potentiel rédox...).

Certains auteurs ont montré en particulier que l'adaptation était beaucoup plus rapide avec des concentrations élevées (Spain 1983, 1990, Wiggins & Alexander 1988, Moormann 1990) et avec l'addition de substrats minéraux alors que l'addition de substrats organiques conduit le plus souvent à une inhibition de l'adaptation (Swindoll et al. 1988, Wiggins & Alexander 1988, Rubin & Alexander 1983).

Cependant, il semble que l'adaptation obtenue avec des concentrations élevées soit moins stable au cours du temps (Fournier 1989) conduisant alors à des pertes d'activités lors de la disparition de la pression de sélection que représente le xénobiotique.

En général, le phénomène d'adaptation sera d'autant plus rapide que les molécules polluantes seront structuralement proches de molécules existantes dans les sols.

Ceci semble être le cas pour les molécules aromatiques étant donné l'abondance de substances à caractère polyphénolique dérivant plus ou moins directement des végétaux (acides phénols, dérivés des tanins, de la lignine, etc...).

Les aromatiques chlorés sont peu abondants, mais ce sont des métabolites caractéristiques des organismes fongiques. Chloramphénicol (Suida & De Bernardis 1973), et niduline, sont produits par des *Aspergillus* ou des *Penicillium* et comportent un ou deux cycles aromatiques porteurs d'atomes de Cl, en même temps que des substituants OH ou OCH₃. On a même décrit la drosophiline A (d'origine fongique) qui a une formule voisine de celle du pentachlorophénol (Birkinshaw 1965).

III-2-1-2 Les supports de l'adaptation

Le support physique de l'adaptation est dans de nombreux cas une molécule d'ADN (Chakrabarty 1982). Les capacités de dégradation des xénobiotiques sont donc portées soit par le chromosome bactérien, soit plus généralement par des éléments extra chromosomiques comme les plasmides cataboliques, les transposons et séquences d'insertion ou encore les bactériophages qui sont des virus à procaryotes (Kearney & Kellog 1985).

- Les virus bactériens ou phages : ils sont constitués de protéines entourant une molécule d'ADN capable de s'intégrer à d'autre fragments d'ADN pour y exprimer des gènes spécifiques, on obtient ainsi un prophage qui n'est plus virulent et qui peut exprimer par exemple des gènes codant pour une voie catabolique nouvelle dans la cellule bactérienne hôte. Il y a peu d'exemples dans la littérature d'adaptation mettant en jeu des bactériophages (Kearney & Kellog 1985).

- Les transposons et les séquences d'insertion : ce sont des fragments d'ADN de petite taille dont la particularité est de posséder aux extrémités des séquences de nucléotides leur permettant de s'insérer dans les molécules d'ADN plus grosses. Ces éléments possèdent en plus des gènes de résistance à des antibiotiques ou à des métaux lourds (Hardy 1984) et peuvent dans certains cas contribuer au catabolisme de produits chlorés (Kawasaki & Tonomura 1981, Slater et al. 1979, Lund et al. 1986).

Le troisième type d'éléments extra-chromosomiques impliqué dans le phénomène d'adaptation est le plasmide catabolique. Il joue certainement le plus grand rôle dans ce processus (Chakrabarty et al. 1989) grâce à sa capacité à être transféré d'une bactérie à une autre essentiellement par le processus de conjugaison, bien que le transfert par transformation naturelle ait été mis en évidence dans les sols.

Les plasmides cataboliques sont des éléments linéaires ou circulaires d'ADN et de poids moléculaire variant de 40 à 200.10⁶ Daltons. Comme tous les plasmides, ils sont autonomes dans les cellules et peuvent s'y trouver en plusieurs copies. Ils sont souvent conjugatifs (transmissibles) et appartiennent à des groupes d'incompatibilité P. Les plasmides

cataboliques de ce groupe peuvent être retrouvés dans des hôtes identiques et sont souvent compatibles entre eux (Hardy 1984, Karns et al. 1987).

De façon générale les plasmides portent une information spécifique :

- Résistance à des antibiotiques, des toxines, des métaux lourds (Chakrabarty 1986).
- Pathogénicité envers d'autres microorganismes ou organismes végétaux ou animaux (Agrobactérium : plasmide Ti).
- Métabolisme de carbohydrates, de xénobiotiques...
- Transmissibilité: facteur F (conjugaison)...

L'intervention de plasmides cataboliques dans la biodégradation de polluants a été mise en évidence dans de nombreux cas (tableau III-3) en particulier pour le 2,4 D ou le 2,4,5 T (Fournier 1989, Kawasaki & Tonomura 1981, Burlage et al. 1989)

Plasmide	Substrat	Taille (MDa)
CAM	Camphre	> 100
OCT	n-Octane	> 100
SAL	Salicylate	58, 48, 42
NAH	Naphtalène	46
TOL	Toluène	76
XYL-K	xylène	90
2-HP	2-Hydroxypyridine	63
NIC	Nicotine/nicotinate	ND
pAC21	p-Chlorobiphényl	65
pKF1	p-Chlorobiphényl	53
pAC25	3-Chlorobenzoate	68
pAC31	3,5-Dichlorobenzoate	72
pUO1	Fluoroacétate	43
pJP2	2,4-D	
pJP4	2,4-D	56
	2,6-Dichlorotoluène	63

Tableau III-3 : Les principaux plasmides cataboliques impliqués dans la dégradation des molécules aromatiques chlorées (d'après Chakrabarty 1986).

Les plasmides cataboliques ont une structure générale assez conservée (figure III-17) et il n'est pas rare d'y trouver un transposon inséré qui passe de ce plasmide vers un autre ou vers le chromosome, pouvant emporter avec lui une partie de l'ADN plasmidique et de l'information génétique (Hardman 1987).

Ces plasmides cataboliques ont des spectres d'hôte relativement larges et peuvent s'exprimer chez divers genres bactériens *Entérobactéries* plus ou moins efficacement, à cause de la nature différente des polymérases ne permettant pas la lecture correcte de cet ADN plasmidique (Frantz 1986).

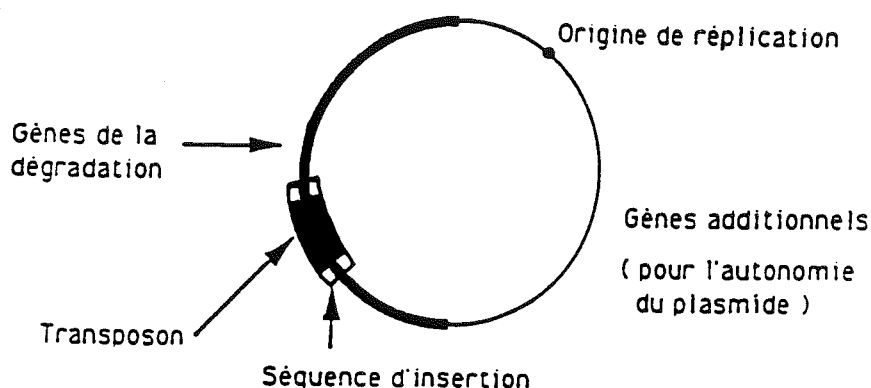


Figure III-17 : Structure générale des plasmides cataboliques

En ce qui concerne les molécules xénobiotiques halogénées on admet que les caractères spécifiques de dégradation sont portés par des plasmides (Chakrabarty 1982), lesquels codent généralement pour deux types d'enzymes : des déshalogénases et des oxygénases (Kearney & Kellog 1985, Kawasaki et al. 1981, Van der Meer et al. 1992).

Parmi les plasmides cataboliques les plus étudiés, on trouve le plasmide pWWO ou plasmide Tol qui porte la voie complète de dégradation du Toluène et du xylène. La majorité des gènes impliqués ont été déterminés et caractérisés ce qui a permis d'établir une voie de dégradation qui passe par la formation de catéchol (figure III-18) (Burlage et al. 1989).

Le catéchol est un produit extrêmement répandu dans les sols, c'est un produit de la décomposition de la lignine sous forme d'acide protocatéchique, c'est également un constituant des tanins (Flaig et al. 1975).

On peut dire en conclusion que l'adaptation de microorganismes à la dégradation de molécules xénobiotiques correspond généralement à des modifications de fonctionnement des cellules provoquées par des mécanismes biochimiques ou génétiques survenant lors du contact des microorganismes avec le polluant exerçant sur eux une pression de sélection. Ces modifications génétiques correspondent soit à une microévolution des microorganismes par mutations ou recombinaisons soit à une macroévolution provoquée par l'entrée dans la cellule d'éléments d'ADN extrachromosomiques, comme des plasmides cataboliques et accessoirement des transposons ou des bactériophages.

Le flux de ces éléments génétiques, dans l'environnement, entre populations microbiennes confère aux cellules une tactique d'adaptation et d'évolution très efficace en réponse à des perturbations du milieu comme la présence de polluants, ce qui leur permet de proliférer quasiment dans n'importe quel environnement (Bollag & Liu 1990).

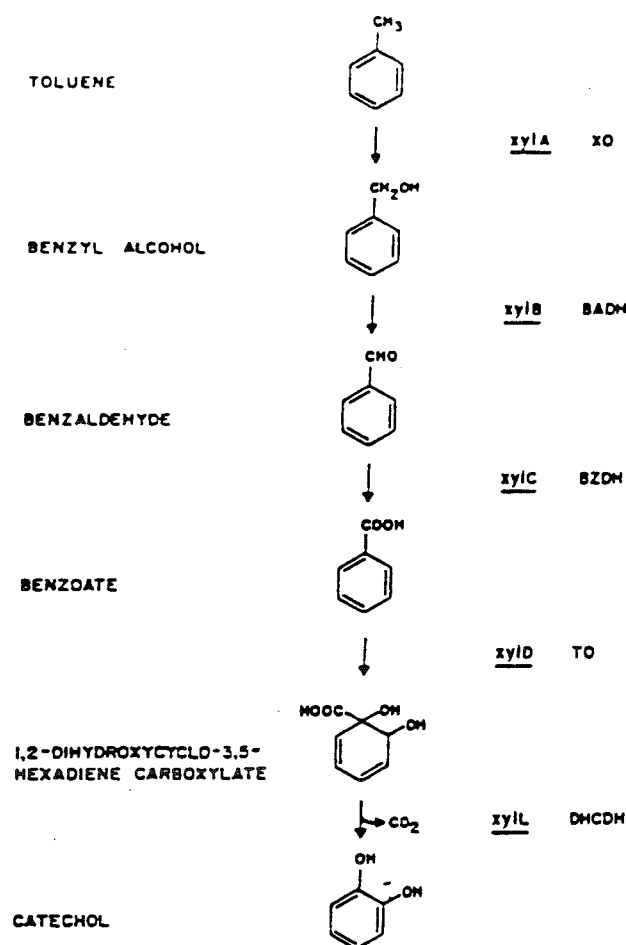


Figure III-18 : Voie de la dégradation du toluène (d'après Burlage 1989)

III-2-2 Les principaux processus de transformation

Dans les milieux naturels, la biotransformation des pesticides peut être due à un métabolisme direct ou à un effet indirect des microorganismes sur l'environnement physique ou chimique conduisant à des réactions de transformation indirecte.

Bollag (1990) a ainsi défini 5 processus impliqués dans les biotransformations de xénobiotiques : la biodégradation, le cométabolisme, la polymérisation, l'accumulation et les effets secondaires de l'activité microbienne.

La biotransformation d'une molécule organique xénobiotique peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément et conduire, suivant les conditions pédoclimatiques à la formation de différents intermédiaires issus du métabolisme d'un ou plusieurs types de microorganismes.

L'amplitude de la transformation des xénobiotiques dans le sol dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Matsumura 1982).

- la température, elle a un effet sur l'activité biologique en stimulant l'activité enzymatique. Il faut noter qu'elle agit aussi sur l'intensité des dégradations chimiques.

- l'humidité, c'est un facteur important quel que soit le type de dégradation mis en jeu, il intervient en particulier dans le fonctionnement des enzymes mais surtout dans le fonctionnement global de la cellule bactérienne puisque l'eau est le vecteur des nutriments donc du xénobiotique.

- le pH, il peut dans certains cas influencer sur les activités enzymatiques, lesquelles ont un pH optimum d'activité.

- la pression d'O₂, c'est un facteur important puisque l'oxygène est nécessaire dans beaucoup de réactions de dégradation et en particulier les oxygénations. Ce facteur intervient également sur la voie métabolique de la dégradation. En effet, il semble que la coupure des liaisons halogénées s'effectue préférentiellement en milieu anaérobie alors que les étapes ultérieures de la dégradation s'effectuent en présence d'une forte pression partielle d'O₂ (Chakrabarty 1986).

La concentration du polluant au contact des microorganismes peut également être un facteur limitant de la biodégradation, en effet, si la majorité du produit se trouve dans un compartiment différent de celui des microorganismes (comme dans l'eau de drainage circulant rapidement), très peu de produit sera disponible pour la biodégradation.

III-2-2-1 La biodégradation spécifique (minéralisation)

C'est le processus le plus intéressant et le plus valorisant du point de vue environnemental puisqu'il contribue à l'épuration totale du milieu pollué. Ce n'est cependant pas le processus le plus répandu. Ce type de métabolisme correspond à l'utilisation des molécules xénobiotiques comme source de carbone et d'énergie conduisant à la synthèse de biomasse avec libération de CO₂ et autres composés minéraux (minéralisation). Ce processus correspond donc en général à une dégradation complète du substrat, bien qu'on puisse observer un catabolisme partiel des molécules permettant néanmoins une croissance bactérienne.

Ce type de biodégradation nécessite la mise en oeuvre d'enzymes très spécifiques comme des déshalogénases ou des dioxygénases (Kearney & Kellog 1985, Van Der Meer et al. 1992) dont les gènes correspondants sont portés le plus souvent par des plasmides (Kawasaki et al. 1981, Slater et al. 1979, Sayler et al. 1986, Kearney & Kellog 1985, Van Der Meer et al. 1992).

III-2-2-2 Le métabolisme accidentel (cométabolisme)

Le métabolisme accidentel correspond à l'utilisation du produit par la cellule bactérienne sans récupération d'énergie ou de carbone (Horvath 1972). Bien qu'inattendu, ce procédé est cependant prépondérant dans le sol (Fournier 1989, Alexander 1977).

Horvath (1972) explique que ce phénomène est dû à un problème de spécificité enzymatique : les premières étapes de la dégradation sont effectuées grâce à la faible spécificité des enzymes mises en jeu, puis la dégradation est stoppée quand l'enzyme nécessaire suivante est absente ou trop spécifique. Les enzymes mises en jeu dans ce type de dégradation sont des enzymes communes à toutes les cellules bactériennes et ayant très peu de spécificité de substrat. Les molécules xénobiotiques sont alors

dégradées par hasard à cause de la faible discrimination exercée par l'enzyme. Ces enzymes sont, pour la plupart, des hydrolases (estérases, amidases, halogénohydrolases...) et des oxygénases (mono et dioxygénases) (Karns et al. 1987). Individuellement, les microorganismes effectuant cette dégradation sont incapables de dégrader complètement les molécules car ils ne possèdent pas le stock enzymatique nécessaire complet. Cependant, dans le sol, des communautés microbiennes seront capables par relais successifs de conduire la dégradation jusqu'au stade ultime de production de CO₂.

De nombreux produits xénobiotiques suivent ce processus de dégradation, comme par exemple les chlorobenzoates (Hartmann et al. 1979) ou les chloroanilines (Bollag & Liu 1990).

Ce type de métabolisme peut conduire dans certains cas à l'accumulation d'intermédiaires plus ou moins toxiques et pouvant conduire à l'inhibition du métabolisme microbien comme c'est le cas pour certains composés aromatiques halogénés (Bollag & Liu 1990).

III-2-2-3 La polymérisation

Dans certains cas, les molécules xénobiotiques ne sont pas biodégradées directement mais transformées par polymérisation, ce qui les rend moins toxiques. C'est un processus faisant intervenir des réactions de couplages oxydatifs par lesquelles les polluants s'associent avec eux mêmes, avec d'autres molécules xénobiotiques ou avec des composés naturels (acides humiques ou fulviques) pouvant conduire à la transformation de résidus liés (Bollag & Loll 1983). C'est le cas pour l'atrazine (Schiavon et al. 1990, Bertin 1989) ou pour les chloroanilines (Matsumura 1982).

Ces xénobiotiques sont ainsi incorporés à la matière organique du sol et peuvent être relargués de manière incontrôlée suivant l'activité des populations microbiennes dans le sol.

III-2-2-4 L'accumulation cellulaire des pesticides

L'accumulation cellulaire des pesticides par des microorganismes (cibles ou non) représente un autre type d'interaction avec les

xénobiotiques. L'adsorption de ces molécules est généralement attribuée à des processus physiques passifs, sans mise en jeu de transporteurs actifs, car dans la plupart des cas les cellules mortes présentent un taux d'adsorption équivalent ou supérieur aux cellules vivantes. Cependant, Cook (1972) a observé un système de transport actif spécifique pour des molécules aromatiques essentiellement de haut poids moléculaire.

Des pesticides comme le DDT, le dieldrin, le méthoxychlor peuvent être absorbés quasiment à 100% en quelques minutes et quelques fois de manière irréversible par des microorganismes ou des algues unicellulaires (Bollag & Liu 1990).

Dans certains cas, cette absorption relativement élevée peut ne pas être couplée à une biodégradation, les cellules microbiennes jouent le rôle de matrice inerte et peuvent être utilisées quelques fois comme indicateurs de pollution, comme c'est le cas pour des algues comme *Cladophora* ou des protozoaires comme *Euglena gracilis* qui accumulent mais ne dégradent pas le DDT (Bollag & Liu 1990).

Bien que ne jouant pas un rôle important dans l'élimination des polluants organiques, l'accumulation cellulaire peut être un mécanisme important de transport de pesticides dans le sol par l'intermédiaire du mouvement microbien.

III-2-2-5 La biodégradation non enzymatique

Les microorganismes peuvent contribuer à la dégradation des polluants de manière indirecte, par leur impact sur le milieu (Matsumura 1982). En particulier, du fait de leur activité, ils pourront entraîner des modifications du milieu, comme des variations de pH pouvant provoquer l'hydrolyse acide ou alcaline de certains composés, ces variations de pH peuvent être dues à la respiration de substrats carbonés ou soufrés provoquant la libération de CO₂ (acidification) ou à l'ammonification lors de la dégradation de composés azotés entraînant l'alcalinisation du milieu (Paul & Clark 1989). Ils peuvent également produire des molécules servant de photorécepteurs, de donneurs ou d'accepteurs d'électrons qui vont contribuer à la photodégradation ou à la dégradation chimique du composé. Les microorganismes peuvent également produire des composés organiques qui serviront d'alkylants (AcétylCoA, Méthylcobalamine...) ou de cofacteurs de réactions non enzymatiques. Ainsi les polyphénols et les

aminophénols pourront entrer dans les réactions de polycondensation humique (Flaig et al. 1975, Bollag et al. 1980).

III-2-3 Les principales réactions biochimiques du métabolisme des pesticides

III-2-3-1 Les processus d'hydrolyse

La mise en jeu d'enzymes hydrolytiques est très répandue chez les microorganismes. Ces enzymes catalysent la coupure d'un certain nombre de liaisons en les remplaçant par des liaisons C-OH. Ces enzymes sont stables sur une échelle de pH et de température large, et elles ne nécessitent pas de cofacteur (Karns et al. 1987). De plus, ce sont en grande partie des exoenzymes qui peuvent attaquer les polluants avant leur entrée dans la cellule.

Parmi ces enzymes, on trouve en particulier des hydrolases, des estérases, des acrylamidases, des phosphatases et des lyases. Parmi les réactions d'hydrolyse, on trouve des déshalogénations mais très peu ont été décrites excepté, celles concernant des molécules aliphatiques comme le dalapon ou le chloroacétate (Slater et al. 1979). Quelques réactions de déshalogénation des cycles aromatiques ont cependant été mises en évidence (Hardmann 1981, Mohn & Tiedje 1992).

III-2-3-2 Les réactions de réduction

Les processus de réduction jouent un grand rôle dans la biodégradation des xénobiotiques organochlorés : ils représentent le mode prépondérant de déshalogénation dans le sol (Matsumura 1982, Mohn & Tiedje 1992).

Les réactions de réduction sont divisées en 3 classes principales, la première est couplée à un système d'oxydation et fait intervenir un cytochrome P450 à l'état réduit (Vogel et al. 1987).

La deuxième classe de réactions met en oeuvre un couple de cofacteurs flavoprotéine-flavine sans intervention enzymatique.

Enfin, la troisième fait intervenir des composés ferro-porphyriniques suivant un processus également non enzymatique.

Ces trois systèmes fonctionnant en phase anaérobie, cela explique que la majorité des réactions de déshalogénation s'effectuent en absence d'O₂.

Les autres types de réactions de réduction concernent essentiellement la saturation de liaisons insaturées doubles ou triples, la réduction des groupements NO₂ (parathion, fénitrothion), de sulfoxydes ou des alcools et aldéhydes.

Il semble que les réactions de déshalogénation soient la principale cause de non persistance dans les sols des composés organo-halogénés, persistance due normalement à la présence de liaisons carbone-halogène. On peut donc s'attendre à ce que le nombre d'atomes d'halogène soit responsable de la durée de vie plus ou moins longue des xénobiotiques dans les sols. Mikesell & Boyd (1985) ont cependant montré que le PCP pouvait être rapidement déchloré alors que des composés aromatiques monochlorés pouvaient persister longtemps dans le sol.

La nature de la molécule intervient donc aussi dans la biodégradabilité, en plus du nombre et de la position des substituants (Bollag & Liu 1990).

III-2-3-3 Les réactions d'oxydation des xénobiotiques

Les systèmes d'oxydation permettent de nombreuses transformations des xénobiotiques, parmi lesquelles la décarboxylation oxydative, la β -oxydation, l'hydroxylation, la N-déalkylation, l'époxydation, la sulfoxydation... et surtout le clivage des cycles aromatiques (tableau III-6)

Cette dernière réaction présente un grand intérêt dans la mesure où une partie importante des molécules xénobiotiques possède au moins un noyau aromatique. Il est intéressant de noter que le clivage des cycles aromatiques est une réaction spécifique au monde microbien (Wallnofer & Engelhardt 1985).

Les enzymes impliquées dans ces réactions d'oxydation appartiennent à des groupes variés comme les peroxydases, les laccases, les oxygénases et les oxydases multi-fonctions.

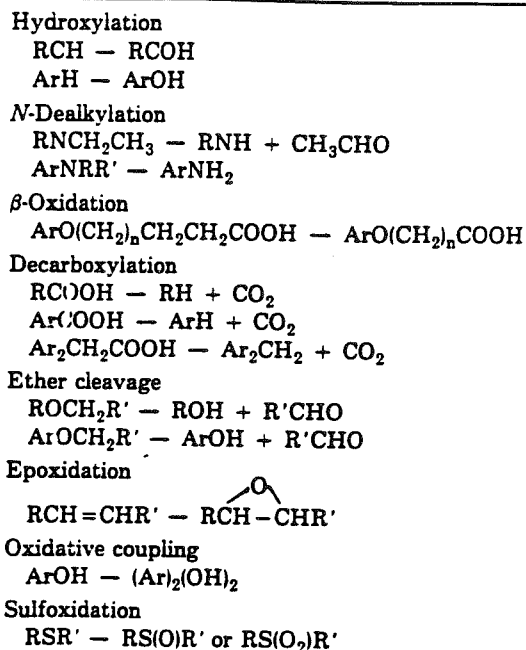


Tableau III-6 : Les principales réactions d'oxydation des xénobiotiques dans les sols (d'après Bollag & Liu 1990).

III-2-3-4 Les autres types de réactions

Les molécules xénobiotiques induisent souvent chez les microorganismes des réactions de détoxification et non de dégradation complète.

Ces réactions conduisent à la diminution ou à la disparition de la toxicité de la molécule, ce sont en particulier les réactions de coupure des liaisons halogénées et les réactions d'alkylation ou de polymérisation (Matsumura 1982). Les liaisons carbone-halogène sont clivées par des réactions de deshydrohalogénéation, conduisant à la formation de liaisons insaturées $\text{C}=\text{C}$.

Les réactions d'alkylation conduisent à des produits méthylés ou acétylés de faible toxicité. C'est le cas par exemple du PCP qui est méthoxylé par certains microorganismes, ce qui conduit au pentachloroanisole moins toxique mais plus persistant (Lamar et al. 1990).

Des réactions de polymérisation enzymatiques sont également décrites, elles conduisent à l'immobilisation des molécules, c'est le cas par exemple de la dichloroaniline qui se dimérise (Matsumura 1982).

III-2-4 La dégradation des molécules organohalogénés aromatiques

Parmi l'ensemble des molécules xénobiotiques produites par l'homme, celles qui possèdent un noyau aromatique sont d'un intérêt tout particulier. Ce sont des molécules très utilisées en agriculture et elles ressemblent à des molécules aromatiques naturellement présentes dans les sols qui sont issues du métabolisme microbien des tissus végétaux.

La dégradation des molécules aromatiques naturelles est une étape vitale dans le cycle du carbone du sol. C'est pour cette raison qu'une grande partie des microorganismes sont capables de l'effectuer, et en particulier les fonges (Wallnofer & Engelhardt 1985). La dégradation de ce type de molécules dans le sol nécessite plusieurs étapes distinctes qui sont fonction de la complexité de la molécule (Dagley 1978).

III-2-4-1 Entrée de la molécule dans la cellule bactérienne

L'entrée de ce type de molécules dans les cellules s'effectue principalement par diffusion à travers des pores membranaires. Des mécanismes de transport spécifique ont cependant été décrits (Cook & Fewson 1972). Ils seraient utilisés surtout pour des grosses molécules ne passant pas à travers les pores des parois bactériennes (porines).

III-2-4-2 Transformation et dégradation des substituants de la molécule

Une fois la molécule dans la cellule, elle subit des transformations tendant à la simplifier et à libérer des sites sur le cycle aromatique. Les réactions mises en jeu sont celles décrites précédemment, à savoir des hydrolyses, des oxydations et des réductions, elles conduisent à des désalkylations, des déshalogénations, des décarboxylations...

Les voies de dégradation des polluants aromatiques dépendent essentiellement du type de microorganisme impliqué, c'est à dire des réactions qu'il peut effectuer jusqu'au clivage du cycle aromatique. Les étapes de déshalogénation s'effectuent avant ou après le clivage du cycle

aromatique, cependant la majorité de ces réactions sont effectuées après clivage en raison de la difficulté à couper des liaisons halogène-cycle aromatique par de nombreux microorganismes (Slater et al. 1979, Mohn & Tiedje 1992).

III-2-4-3 Activation du cycle aromatique

Le principe de l'activation de la molécule aromatique déjà simplifiée par les étapes précédentes consiste à la transformer en un composé dihydroxybenzénique avec des groupements hydroxyles généralement en position ortho ou para.

Les principaux composés ainsi obtenus sont des dérivés catéchol ou hydroquinone et 3 composés jouent un rôle central dans les voies de dégradation des xénobiotiques aromatiques : le catéchol, les acides protocatéchique et gentisique (Figure III-19).

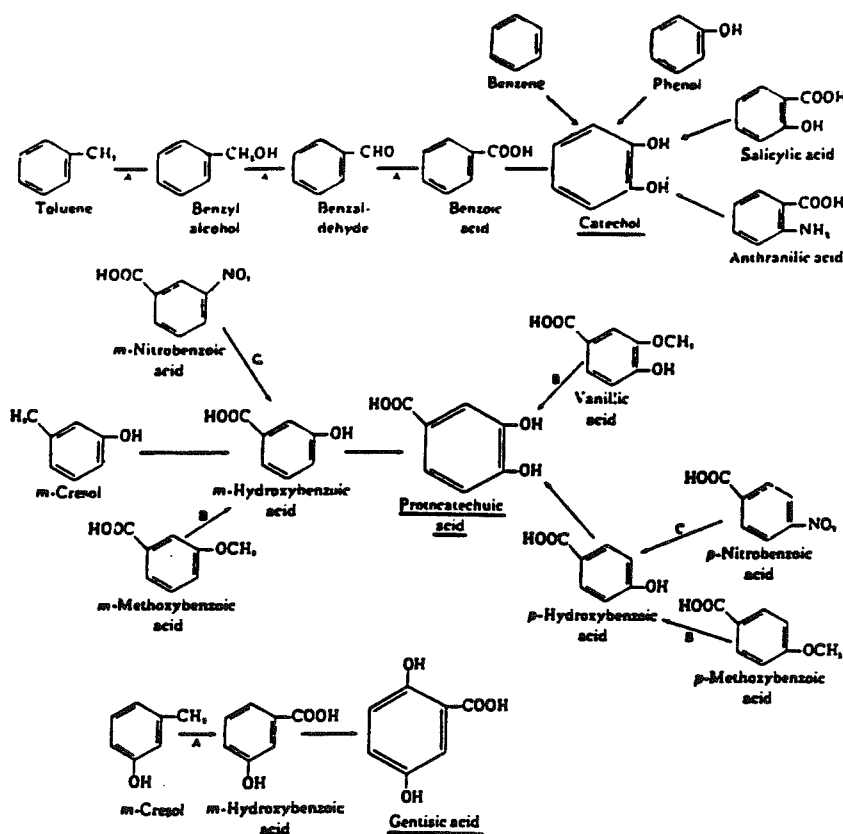


Figure III-19 : Rôle central du catéchol et des acides protocatéchique et gentisique dans les voies de dégradation des xénobiotiques (d'après Alexander 1977)

La réaction mise en jeu dans l'activation consiste à incorporer un atome d'oxygène sur le cycle aromatique selon la réaction (Wallnofer & Engelhardt 1985) :



Cette réaction s'effectue selon deux mécanismes, le premier permettant l'incorporation d'un OH et mettant en jeu une monooxygénase (hydroxylase) qui est souvent une flavoprotéine ou dans certains cas, un cytochrome P450. Les phénols, crésols et autres molécules hydroxylées sont des substrats de cet enzyme.

Le second mécanisme fait intervenir une dioxygénase et une déshydrogénase regroupées en un complexe qui catalyse la dihydroxylation en ortho du cycle de molécules ne possédant pas de groupements OH (Wallnofer & Engelhardt 1985).

III-2-4-4 Clivage du cycle aromatique

La réaction responsable du clivage du cycle aromatique, consiste à y introduire les deux atomes d'une molécule d'O₂ par une enzyme dioxygénasique pendant que la coupure de la liaison insaturée s'effectue (Alexander 1977). Cette coupure peut s'effectuer en position intradiol (voie ortho) par la catéchol, 1, 2, dioxygénase dans le cas du catéchol ou en position extradiol (voie méta) par la catéchol, 2, 3, dioxygénase (figure III-20).

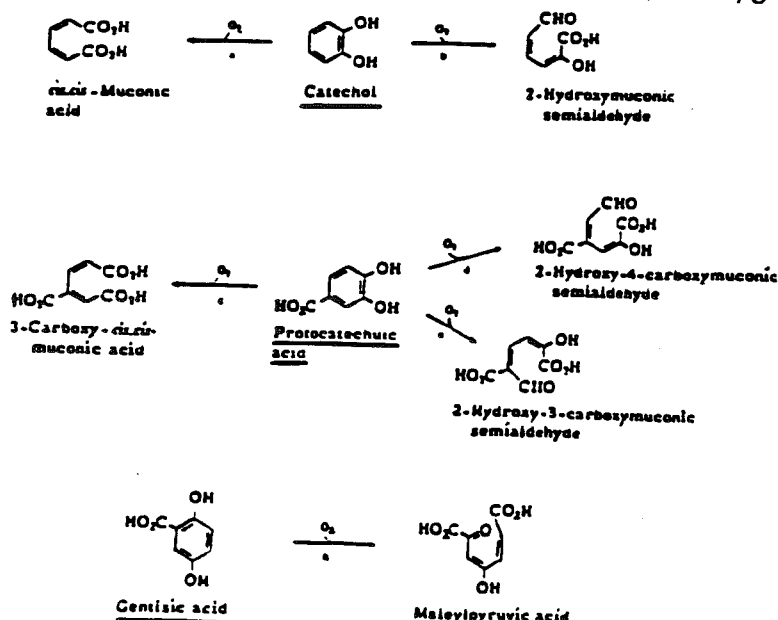


Figure III-20 : Le clivage du cycle aromatique du catéchol et des acides protocatéchique et gentsique dans les sols (d'après Alexander 1977)

Pour les dérivés des acides protocatéchique et gentisique, les deux voies sont possibles.

La voie de clivage suivie dépend des substituants de la molécule (position et nature) et du microorganisme impliqué (Alexander 1977).

Après clivage du cycle aromatique, la molécule subit d'autres réductions et oxydations conduisant à des intermédiaires du cycle de Krebs (figure III-21).

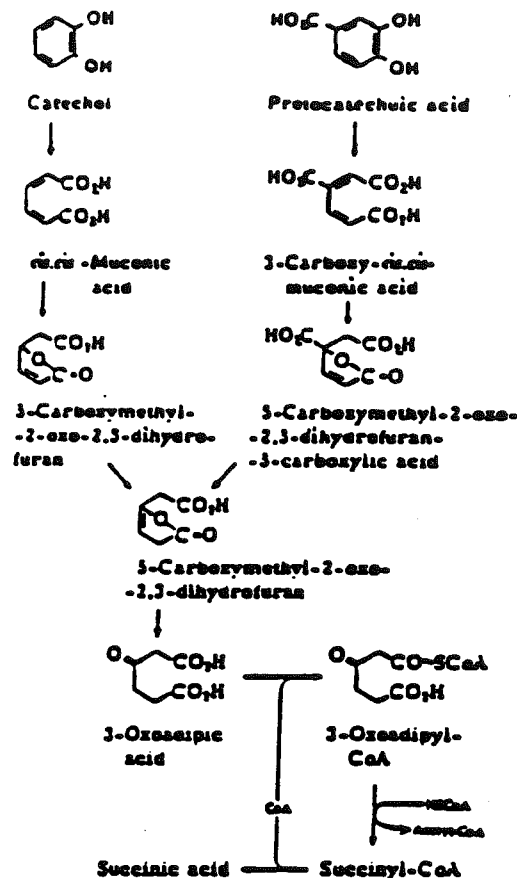


Figure III-21 : Principales voies de dégradation du catéchol et de l'aide protocatéchique dans les sols (d'après Alexander 1977)

L'ensemble de ces étapes de dégradation des cycles aromatiques peut s'effectuer en conditions anaérobies par des mécanismes et à des taux différents.

Elles nécessitent cependant des capacités spécifiques de la part des microorganismes : photométabolisme anaérobie, respiration des nitrates ou fermentation méthanogène (Wallnofer & Engelhardt 1985). C'est un métabolisme relativement rare.

III-2-5 Aspects biotechnologiques du métabolisme des pesticides

III-2-5-1 Utilisation de microorganismes et d'enzymes pour le traitement de sols pollués

Les travaux d'Audus (1951) sur la détoxification par voie microbienne de sols pollués par le 2,4 D ont permis d'ouvrir la voie à ce genre de pratique après avoir pris conscience de l'énorme potentiel que représentent les microorganismes dans ce domaine (Alexander 1980, Chakrabarty 1986).

Ces constatations ont alors conduit à la course à l'isolement de microorganismes possédant des potentialités cataboliques favorables à l'élimination des molécules xénobiotiques dans les sols. C'est ainsi que de nombreuses souches bactériennes et fongiques dégradant un large spectre de xénobiotiques ont été isolées (Watanabe 1973, Saber & Crawford 1985, Knackmuss & Brillon 1981, Bumpus & Aust 1987).

Certaines ont été rapidement utilisées dans des essais de bioremédiation de sols contaminés, quelques fois avec succès (Audus 1951, Kearney et al. 1969, Daughton et al. 1977, Thomas & Ward 1989, Edgehill & Finn 1983, Mc Carty 1988, Brubaker & Exner 1988, Frick et al. 1988). Dans certains cas, les essais étaient sans effet (Mueller et al. 1991) ou nécessitaient des adaptations particulières comme la mise en anaérobiose du sol (saturation en eau) (Kaake et al. 1992, Mikesell & Boyd 1985) ou la modification de la température (Jenkins et al. 1985).

Ces résultats signifient que l'obtention de microorganismes adaptés à la dégradation de pesticides particuliers n'est qu'une étape dans les essais de bioremédiation. Des paramètres importants comme la survie de ces populations dans les sols et en conditions naturelles ainsi que la conservation de leurs capacités dégradatives dans des conditions hostiles doivent être pris en compte.

Le passage du laboratoire au terrain nécessite donc certaines précautions, d'autant plus qu'un microorganisme, aussi efficace soit-il, ne présente pas du tout les mêmes caractéristiques de croissance, de colonisation ou d'activités sur un milieu synthétique de culture que dans le

milieu hétérogène qu'est le sol où il est confronté le plus souvent à des conditions environnementales peu favorables et surtout très variables.

La connaissance du fonctionnement des microorganismes isolés dans les sols est donc une étape préalable à la mise en place d'essais de bioremédiation. La bioremédiation est d'ailleurs encore peu répandue ou développée sur le terrain en raison notamment du retard dans la législation dans ce domaine.

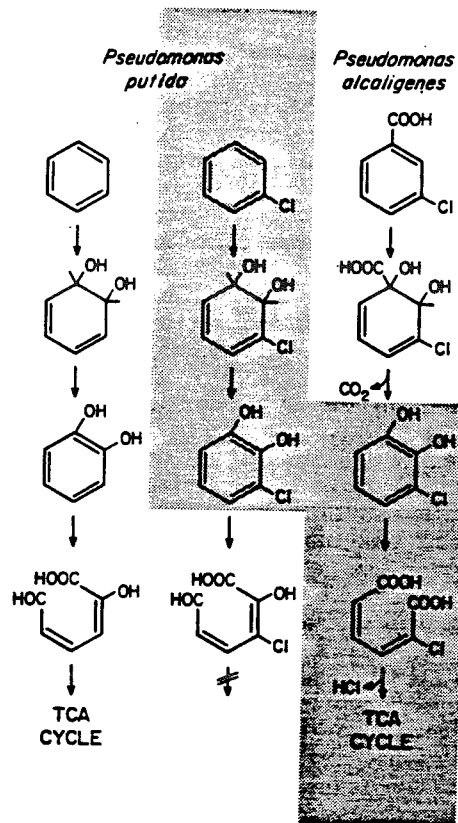
Les réticences des pouvoirs publics ou de l'opinion publique à la dispersion de microorganismes éventuellement génétiquement modifiés proviennent de ce que l'introduction de microorganismes dans les sols est perçue comme un processus incontrôlé et incontrôlable (Bull et al. 1988).

III-2-5-2 Obtention de microorganismes adaptés

La biodégradation des molécules dans les sols par catabolisme spécifique passe par l'obtention de capacités nouvelles soit par microévolution (mutations) soit par macroévolution (acquisition d'éléments génétiques extrachromosomiques) (Kearney & Kellog 1985, Hardman 1987).

On distingue, à l'heure actuelle, deux voies possible pour l'obtention de microorganismes adaptés à des catabolismes spécifiques. La première consiste à provoquer *in vitro* le transfert des capacités cataboliques d'une souche bactérienne à une autre afin de conférer à celle-ci une voie complète ou partielle de la dégradation d'un xénobiotique. Ceci peut se faire par transfert de tout ou partie d'un plasmide catabolique vers une souche ne possédant qu'une partie des gènes nécessaires à la dégradation totale (Focht 1988, Hartman et al 1980, Hardman 1987, Chapman 1988). Les deux souches utilisées doivent être d'une parenté relative afin de diminuer les problèmes d'expression du plasmide (Figure III-22).

La deuxième technique consiste à provoquer également *in vitro* et à petite échelle le phénomène d'adaptation observé au champ. Il faut pour cela mettre en contact la biomasse microbienne d'une fraction de sol avec le xénobiotique que l'on veut étudier ou avec un analogue structural (co-métabolisme) pendant un temps plus ou moins long (Alexander 1977).



Le transfert d'un plasmide spécifique appartenant à la souche *Pseudomonas alcaligenes* vers la souche de *Pseudomonas putida* permet à celle-ci d'acquérir la voie ortho de dégradation du chlorocatéchol, qu'elle était incapable d'effectuer auparavant.

Figure III-22 : Construction d'une nouvelle souche bactérienne par transfert de plasmide (d'après Focht 1988)

Dans les deux cas une phase, dite d'enrichissement, est nécessaire. Pour cela la molécule est mise en contact avec soit les deux souches bactériennes précédentes, soit une fraction de sol.

La phase d'enrichissement s'effectue avec divers dispositifs :

- en batchs, on place les microorganismes dans une enceinte close avec le produit chimique pendant la durée de temps désirée (Stanlake & Finn 1982),

- en chémostats, on place les bactéries ou le sol dans une enceinte à travers laquelle on fait circuler en continu une solution renouvelée de produit (Knackmuss & Brillon 1981, Moos & Kirsch 1983).

- en colonnes, on fait percoler une solution de xénobiotique à travers une colonne de sol. On a alors un système de chémostat si la

solution est renouvelée continuellement (Herbert 1982) et un système de batch dans le cas contraire (Watanabe 1973).

Certains facteurs déterminent l'efficacité de l'enrichissement, en particulier l'effet de la concentration peut influencer sur la stabilité de l'adaptation des microorganismes (Fournier 1989). En effet dans de nombreux cas d'enrichissements avec de trop fortes concentrations, la perte des capacités de dégradation acquises a été observée lors du retrait du produit chimique. De plus, on a pu observer que des microorganismes adaptés selon ce procédé étaient incapables de s'attaquer à de faibles concentrations en xénobiotiques qui correspondent plus à celles rencontrées dans les sols (Fournier 1989, Spain 1990).

La durée de l'enrichissement joue également sur son efficacité, en particulier pour l'adaptation à la dégradation de faibles concentrations qui nécessitent une évolution souvent très longue (Fournier 1989), tout comme l'adaptation génétique.

Un autre critère important dans les protocoles d'enrichissement est l'oxygénation du système. On a vu auparavant que certaines étapes de la biodégradation sont favorisées en conditions anaérobies (déshalogénations, réductions...) alors que d'autres sont favorisées en présence d'O₂ (oxydations, clivage des cycles aromatiques...). L'aération est donc un facteur important pour la dégradation du produit mais également pour l'enrichissement puisque selon le degré d'oxygénation, on favorisera l'adaptation à l'un ou l'autre des processus. L'aération règle donc l'enrichissement et la nature des microorganismes.

Une fois la phase d'enrichissement terminée, il faut mettre au point un protocole de sélection des microorganismes adaptés, il faudra en particulier les différencier du reste de la population microbienne (Herbert 1982). Pour cela, on prépare généralement un milieu de culture solide contenant le xénobiotique comme seule source de carbone et d'énergie (ou d'azote) et éventuellement un co-substrat pour le cas où la biodégradation est effectuée par co-métabolisme (Fournier 1989).

On peut également ajouter un facteur permettant une détection directe sur le milieu de sélection comme par exemple un indicateur coloré pour le cas où la dégradation de la molécule entraîne une variation de pH dans le milieu. C'est souvent le cas pour les molécules halogénées (Saber & Crawford 1985). Dans ce cas, les colonies bactériennes compétentes sont

entourées d'un halo spécifique. D'autres types de sélection peuvent être envisagés suivant la structure du xénobiotique utilisé.

Une fois les souches sélectionnées, des repiquages successifs sur le milieu de sélection permettent d'isoler et de purifier des souches adaptées à la dégradation du produit.

III-3 Modélisation de la biodégradation des pesticides

Comme nous avons pu le voir tout au long de ce chapitre, les biotransformations des pesticides sont sensibles à de nombreux facteurs biotiques et abiotiques souvent variables dans le temps. Le taux de transformation varie également avec le temps et avec l'adaptation à cette biotransformation de populations de plus en plus nombreuses.

Une représentation mathématique de ces processus doit donc en toute rigueur prendre en compte la plupart de ces facteurs (dont l'adaptation) qu'il faut estimer indépendamment pour avoir une valeur prédictive. Cependant, on comprend aisément qu'une approche déterministe de ce type est extrêmement difficile à développer car ces paramètres sont rarement indépendants et ils fluctuent de manière incontrôlable.

Une approche plus phénoménologique, (tout comme dans le cas de la modélisation des interactions physico-chimiques), semble donc devoir être suivie, moyennant quelques simplifications.

Cette approche consiste à complexifier progressivement un modèle relativement simple décrivant correctement la biodégradation en batch en milieu liquide, en ajoutant des termes caractéristiques des phénomènes observés dans les sols comme la limitation en substrats, en cosubstrats, les phénomènes de diffusion ou encore l'écoulement de l'eau.

La modélisation des processus de biodégradation peut s'inspirer du modèle de Monod (1949) qui constitue dans la littérature une référence (Richter 1993, Simkins & Alexander 1985, Schmidt et al. 1987, Chen et al. 1992).

III-3-1 Modélisation de la biodégradation en phase liquide

Le modèle de Monod (1949) a été développé pour la dégradation du glucose à des concentrations suffisamment élevées pour produire de la biomasse.

Il est basé sur un certain nombre d'hypothèses qui impliquent la prise en compte d'un minimum de facteurs affectant la cinétique de biodégradation : la concentration en xénobiotique et le nombre de microorganismes adaptés à sa dégradation.

Si l'on veut faire intervenir d'autres facteurs tels que la concentration en O_2 , la présence d'autres substrats ou encore la possibilité de fixation du substrat sur la matière organique, il faut introduire d'autres termes dans l'équation de base.

Les notations utilisées par la suite seront les suivantes :

S_0	: Concentration en substrat à l'origine	(mol.l-1)
S	: Concentration en substrat en cours de dégradation	(mol.l-1)
B_0	: Population bactérienne à l'origine (Nb de cellules.l-1)	
B	: Population bactérienne en cours de dégradation	
q	: Inverse du rendement des cellule (mol/Nb de cellules)	
$X_0 = qB_0$: Quantité de substrat nécessaire à la production de la population B_0	(mol.l-1)
$X = qB$: Quantité de substrat nécessaire à la production de la population B	(mol.l-1)

Le bilan de masse relatif à une dégradation d'un état initial (S_0 , B_0) à un état donné (S , B), s'écrit :

$$S_0 + qB_0 = S + qB \quad (III-1)$$

$$\text{soit } S_0 + X_0 = S + X \quad (III-2)$$

Ceci suppose que la population croît en fonction de la consommation en substrat et on suppose que q reste constant au cours du temps, ce qui peut ne pas être le cas si l'on considère le phénomène d'adaptation.

La quantité de substrat nécessaire au maintien cellulaire (ensemble du métabolisme permettant la survie de la cellule sans qu'elle se reproduise) n'est pas prise en compte.

Le rendement des cellules est également supposé constant quelle que soit la concentration en substrat. Ces équations ont été établies sur la base de la biodégradation du glucose par des bactéries glucose⁺. Les réactions de déhalogénéation peuvent ne pas impliquer de consommation d'O₂.

La modélisation de Monod (1949) considère que le taux d'évolution $\frac{dB}{dt}$ d'une population est proportionnel au nombre d'individus B, soit :

$$\frac{dB}{dt} = \mu B \quad (\text{III-3})$$

μ a la dimension de l'inverse d'un temps (h⁻¹)

Ceci conduit à une croissance exponentielle de la population et n'est vrai que si aucune limitation n'intervient (manque de substrat notamment).

L'idée suivante (Monod 1949) consiste à introduire l'effet de concentration en substrat dans le coefficient μ , soit :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (\text{III-4})$$

μ_{\max} est le taux maximal de dégradation du substrat dans des conditions définies et K_s , une constante d'affinité du microorganisme pour le substrat.

On peut donc écrire à partir de III-1, III-2, III-3, et III-4 :

$$-\frac{dS}{dt} = \mu_{\max} \frac{S(S_0 + X_0 - S)}{S + K_s} \quad (\text{III-5})$$

L'équation III-5 donne la variation temporelle non linéaire de la diminution de la concentration en substrat.

Cette équation peut être simplifiée en fonction des conditions particulières du système considéré :

	Forme différentielle et paramètres Forme intégrée	Conditions
Ordre zéro (I)	$-\frac{dS}{dt} = k_1 \text{ avec } k_1 = \mu_{\max} X_0$ $S = S_0 - k_1 t$	$X_0 \gg S_0$ $S_0 \gg K_s$
Monod sans croissance (II)	$-\frac{dS}{dt} = k_2 \frac{S}{K_s + S} \text{ avec } k_2 = \mu_{\max} X_0$ $K_s \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) + S - S_0 = -k_2 t$	$X_0 \gg S_0$
Premier ordre (III)	$-\frac{dS}{dt} = k_3 S \text{ avec } k_3 = \mu_{\max} \frac{X_0}{K_s}$ $S = S_0 e^{-k_3 t}$	$X_0 \gg S_0$ $S_0 \ll K_s$
Logistique (IV)	$-\frac{dS}{dt} = k_4 S(S_0 + X_0 - S) \text{ avec } k_4 = \frac{\mu_{\max}}{K_s}$ $S = \frac{S_0 + X_0}{1 + \frac{X_0}{S_0} e^{k_4 (S_0 + X_0) t}}$	$S_0 \ll K_s$
Monod avec croissance (V)	$-\frac{dS}{dt} = \mu_{\max} \frac{S(S_0 + X_0 - S)}{S + K_s}$ $K_s \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = (S_0 + X_0 + K_s) \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) - (S_0 + X_0) \mu_{\max} t$	
Logarithmique (VI)	$-\frac{dS}{dt} = \mu_{\max} (S_0 + X_0 - S)$ $S = S_0 + X_0 (1 - e^{\mu_{\max} t})$	$S_0 \gg K_s$

Tableau III-7 : Le modèle de Monod, ses différentes expressions simplifiées et ses formes intégrées (d'après Scow et al. 1986)

La figure III-23. montre les courbes de variation de concentration relative en substrat (S/S_0) obtenues avec 4 des équations décrites ci-dessus, pour des valeurs de μ_{\max} , X_0 , S_0 et K_s constantes pour chaque modèle.

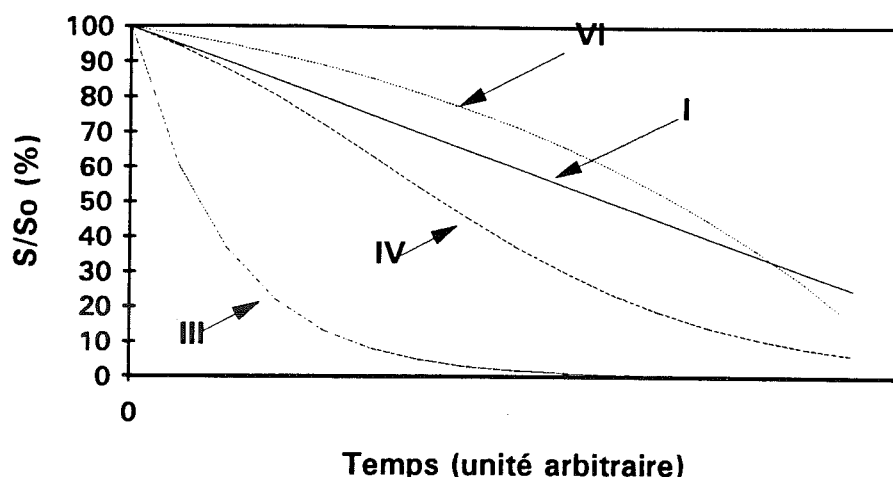


Figure III-23 : Cinétiques de dégradation obtenues avec différentes simplification du modèle de Monod : I Ordre Zéro; III Premier Ordre; IV Logistique; VI Logarithmique (d'après Tessier 1993)

Dans les sols, la dégradation des pesticides s'effectue en grande majorité par cométabolisme (Bollag & Liu 1990, Alexander 1981), c'est à dire sans récupération d'énergie ou de carbone pour la synthèse de biomasse.

Dans le cas de pollution diffuse, et même dans presque tous les cas, la biosynthèse, aux dépens des molécules xénobiotiques, sera nulle ou négligeable, le modèle de Monod sans croissance apparaît donc comme le plus adapté pour la description du phénomène de biodégradation dans les sols en conditions naturelles.

Toutefois, pour des études de laboratoire dans des milieux simples, avec des populations microbiennes dégradant spécifiquement un type particulier de composé chimique présent à des concentrations suffisamment élevée, il est possible d'observer une production de biomasse donc une multiplication cellulaire. Dans ce cas, le modèle à utiliser devra être choisi en fonction des conditions initiales (X_0 , S_0).

Les paramètres intrinsèques aux cellules microbiennes (μ_{\max} et K_s) sont déterminés en réacteurs fermés, dans des conditions bien définies, en mettant en contact une concentration de xénobiotique connue et une population bactérienne de taille connue. La vitesse de dégradation étant directement dépendante de la concentration en substrat (équ. III-4), en

faisant varier cette concentration on obtient plusieurs courbes de dégradation (figure III-24) à partir desquelles on détermine les vitesses de dégradation initiales qui sont représentées par la pente de la tangente à l'origine de ces courbes.

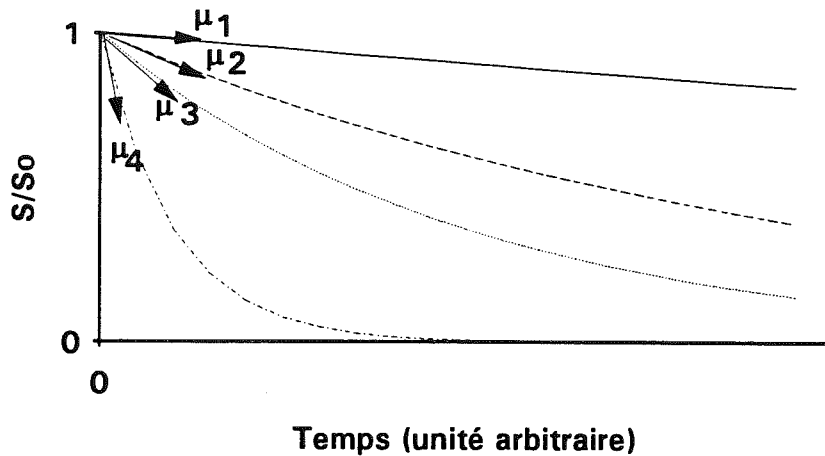


Figure III-24 : Vitesses initiales de dégradation à partir de différentes concentrations en substrats (avec une densité de population bactérienne constante).

Le report des valeurs des vitesses initiales de dégradation et des concentrations en substrat permet de déterminer les valeurs de μ_{\max} et K_s graphiquement en utilisant une des nombreuses représentations graphiques de l'équation III-4 utilisées classiquement en biochimie comme par exemple la représentation linéaire directe d'Eisenthal et Cornish-Bawden comme le montre la figure III-25.

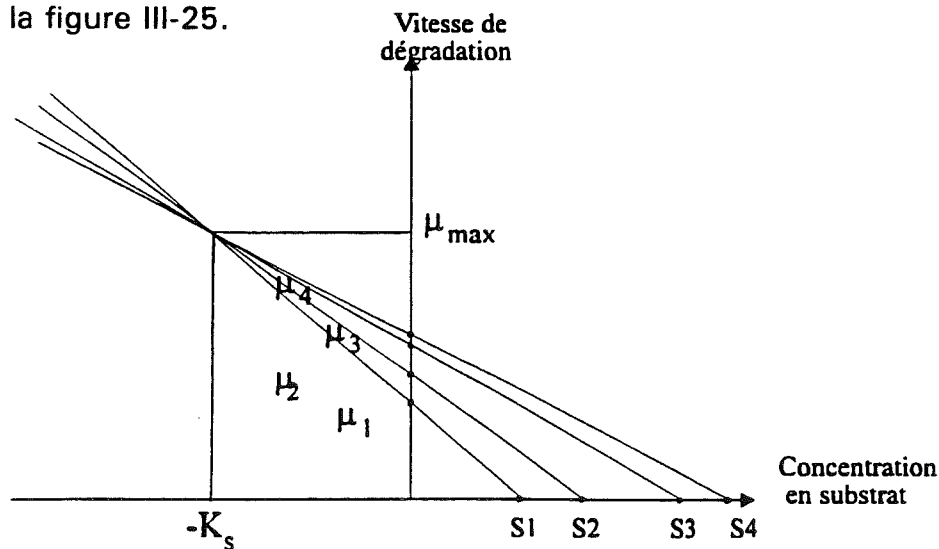


Figure III-25 : Détermination graphique de μ_{\max} et K_s à l'aide de la représentation linéaire directe d'Eisenthal et Cornish-Bawden

Les valeurs ainsi déterminées correspondent aux valeurs maximales pouvant être observées, car obtenues en conditions optimales sans limitation d'aucune sorte, ce qui n'est pas toujours le cas dans le sol.

Le modèle de Monod donne généralement une bonne représentation de la biodégradation en milieu liquide, il ne faut cependant pas oublier qu'il implique que le substrat, en l'occurrence le xénobiotique, est le facteur limitant la croissance, ce qui n'est jamais le cas dans les sols où l'on trouve toujours de nombreuses autres sources de carbone qui serviront en priorité pour la biosynthèse. En revanche, d'autres oligo-éléments essentiels pourront être limitants.

Certains modèles plus complexes prennent en compte ces limitations de cosubstrats ou des facteurs d'inhibition (Chen et al. 1992), ou les phénomènes de diffusion dans les agrégats du sol (Richter et al. 1993, Priesack & Kisser-Priesack 1993, Nietfield et al. 1992) ou encore l'adsorption et l'écoulement (Angle et al. 1992, Mc Bride et al. 1992).

Le point de départ de ces modèles est généralement constitué par l'équation de cinétique enzymatique de Michaëlis et Menten (analogue au modèle de Monod) en raison du caractère enzymatique de la biodégradation des molécules xénobiotiques :

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{v_{\max}C}{K_m + C} \quad (\text{III-6})$$

- . C = concentration en xénobiotique (mol.l⁻¹)
- . V_{max} = Vitesse maximale de dégradation
(équivalent à μ_{\max}) (mol.l⁻¹.s⁻¹)
- . K_m = concentration à V_{max}/2
(représente l'affinité de l'enzyme pour le substrat) (mol.l⁻¹)

III-3-2 Introduction d'une inhibition due au substrat

A de grandes concentrations, l'inhibition de l'activité microbienne a lieu fréquemment. Cet effet est modélisé par analogie à une réaction enzymatique par un terme correspondant à une inhibition non compétitive par le substrat (Richter et al. 1993).

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{v_{\max}C}{K_m + C} \frac{1}{1 + \left(\frac{C}{K_I}\right)^v} \quad (\text{III-7})$$

ou K_I = constante d'inhibition par le substrat

(mol.l⁻¹)

et v = ordre de l'inhibition

(adimensionnel)

Ceci peut être intéressant en particulier pour modéliser la détoxification des métaux lourds dans les sols.

III-3-3 Introduction d'une dynamique de population

Si la dégradation est utilisée pour fournir de l'énergie à l'organisme, la croissance de la population de cet organisme dépend de la concentration en pesticide. Les équations suivantes unissent la dynamique de la population et la consommation du substrat :

$$\begin{cases} \frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{\max}C}{C + K_m} \frac{1}{1 + \left(\frac{C}{K_I}\right)^v} B \\ \frac{dB}{dt} = \gamma \frac{\mu_{\max}C}{C + K_m} \frac{1}{1 + \left(\frac{C}{K_I}\right)^v} B - \alpha(1 + \beta B)B \end{cases} \quad (\text{III-8})$$

Dans la seconde équation III-8, ont été introduits :

γ = Facteur de croissance de la biomasse

(adimensionnel)

α = Taux de mortalité microbienne

(s⁻¹)

β = Taux de mortalité dépendant de la croissance

(Nb de cellules⁻¹)

Ces paramètres représentent le fonctionnement des cellules.

La croissance cellulaire aux dépens des molécules xénobiotiques étant rare dans les sols, le paramètre γ est souvent nul, on ne considère alors que le taux de mortalité cellulaire.

III-3-4 Modèle prenant en compte l'inhibition par des cosubstrats et une dynamique de population

Certains modèles comme celui développé par Chen et al. (1992) prennent en compte simultanément une croissance cellulaire et une inhibition par des substrats. Ceci conduit à l'obtention d'un modèle extrêmement complexe nécessitant un nombre impressionnant de paramètres et reposant sur des hypothèses difficilement vérifiables (indépendance des différents paramètres entre eux).

Ce modèle, développé pour la dégradation du benzène et du toluène dans un sédiment, a néanmoins permis de simuler de manière satisfaisante des résultats expérimentaux obtenus en colonnes.

III-3-5 Prise en compte de la diffusion vers des agrégats

Les composés chimiques susceptibles d'être dégradés par des microorganismes dans le sol sont souvent limités dans leur disponibilité par l'adsorption et la diffusion vers des sites favorables.

Scow et Alexander (1992) ont développé un modèle tenant compte de ces phénomènes. Ce modèle utilise le concept de compartiments que nous n'avons pas utilisé jusqu'ici. La figure III-26 représente de façon très schématique les compartiments et leurs interrelations.

Les agrégats sont supposés sphériques et la loi d'adsorption linéaire. Dans ces conditions, l'équation de diffusion peut être mise sous la forme (en coordonnées sphériques) :

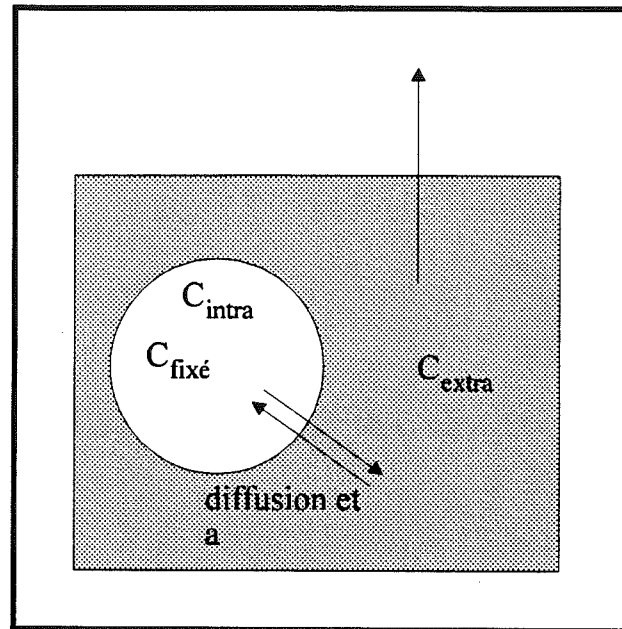
$$R \frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (\text{III-9})$$

avec

- R facteur de retard ($R = 1 + \rho K / \varepsilon$) ρ est la densité sèche de l'agrégat (g.cm^{-3}), K coefficient de distribution ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$), ε la porosité de l'agrégat.
- C concentration de la solution (g.l^{-1})
- D coefficient de diffusion ($\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$)
- r distance radiale dans l'agrégat (cm)

On peut convertir cette équation sous forme monodimensionnelle en remplaçant $C.r$ par u :

$$R \frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} \quad (\text{III-10})$$



C_{intra} représente la concentration de la solution dans l'agrégat (g.l^{-1})

C_{extra} représente la concentration de la solution hors de l'agrégat (g.l^{-1})

$C_{\text{fixé}}$ représente la concentration sur les surfaces de l'agrégat (g.l^{-1})

Figure III-26 : Représentation schématique des relations existantes entre les différents compartiments (Scow & Alexander 1992).

La dégradation est modélisée par une répartition homogène des microorganismes dans la solution extraagrégats par l'équation simplifiée de Monod suivante :

$$-\frac{dC}{dt} = k_1 C \quad (\text{III-11})$$

L'utilisation de ce modèle pour simuler des courbes de dégradation a été réalisée par Scow et Alexander (1992). La figure III-27 présente les résultats obtenus pour la dégradation du phénol- ^{14}C par une souche de

Pseudomonas avec des agrégats argileux d'un rayon variant entre 0.55 et 0.75 cm :

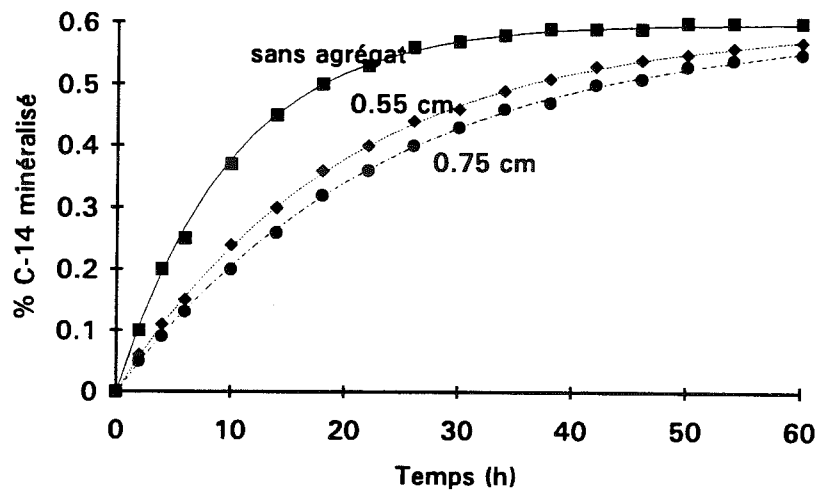


Figure III-27 : Cinétique de minéralisation du phénol par *Pseudomonas* sp. en présence et en absence d'agrégats d'argiles de 0.55 et 0.75 cm de rayon (d'après Scow et Alexander 1992).

Ce modèle beaucoup moins complexe que le précédent introduit une notion importante pour le sol qui est la diffusion et l'adsorption du substrat dans les agrégats.

En effet, ces phénomènes tendant à diminuer la concentration en xénobiotique en contact avec les cellules adaptées à la dégradation. Par conséquent, les paramètres de dégradation obtenus dans les sols, et en particulier K_S , ne seront pas ceux déterminés en milieu liquide car les vitesses de dégradation introduites ne correspondront pas celles obtenues avec les concentrations que voient les cellules.

CONCLUSION

Les approches hydrodynamique et physico-chimique n'ayant pu, dans de nombreux cas, expliquer le comportement de pesticides dans les sols (disparition ou transformation), la prise en compte de la composante biologique des sols est devenue incontournable et en particulier l'aspect microbiologique.

Nous avons pu voir au cours de ce chapitre que la communauté microbienne des sols ne se répartit pas au hasard mais plutôt en fonction des relations trophiques et de prédation ou de compétition existant entre les différentes espèces qui peuplent cet environnement.

Les aspects biologiques du devenir des pesticides peuvent donc être abordés sous l'angle plus général de la dégradation des composés organiques naturels dans les sols. Cette dégradation, et en particulier celle des molécules aromatiques, s'effectue exclusivement par des microorganismes fongiques ou bactériens.

Les principaux modes de dégradation des pesticides dans les sols ont pu être déterminés ainsi que les réactions enzymatiques impliquées, grâce à l'isolement de microorganismes compétents pour leur dégradation.

Ce type d'étude a permis le développement des aspects biotechnologiques de la dégradation des pesticides, ce qui a conduit à la construction de souches microbiennes génétiquement modifiées, actuellement utilisées pour la bioremédiation des sols pollués.

Cependant, l'échec de nombreux essais de bioremédiation ainsi que les difficultés rencontrées pour la prédiction de la dégradation de certains produits xénobiotiques dans les sols impliquent que les mécanismes gouvernant ces processus n'ont pas été parfaitement compris et que les paramètres prépondérants n'ont pu être identifiés.

Ainsi, la modélisation de la dégradation des pesticides dans les sols est souvent construite autour du modèle de Monod qui, il faut le rappeler a été développé pour la dégradation du glucose utilisé comme source de carbone et d'énergie, et permettant la synthèse de biomasse, ce qui est rarement le cas pour les pesticides.

L'incorporation dans ce modèle de paramètres prenant en compte le caractère spécifique des molécules pesticides (faibles concentration, toxicité, dégradation par cométabolisme...) est indispensable, de même que les paramètres liés à la diffusion des molécules vers les bactéries, en particulier celles en position interne.

Par ailleurs, il peut être dangereux de séparer l'étude de la composante biologique de celle des interactions physico-chimiques ou de l'hydrodynamique. En effet, le sol étant un milieu hétérogène et complexe, il apparaît clair que chacun des processus peut intervenir simultanément et surtout influencer sur les autres.

Ainsi, les interactions physico-chimiques vont avoir tendance à limiter la quantité de pesticide biodisponible alors que les activités biologiques pourront avoir des effets néfastes pour la qualité des eaux souterraines en libérant des xénobiotiques initialement liés à la matière organique.

La compréhension de la compartimentation du produit xénobiotique et la connaissance de la distribution des microorganismes dans le sol sont donc deux paramètres indispensables puisqu'ils vont déterminer la possibilité de contact molécule-microorganisme incontournable pour qu'il y ait biodégradation.

CHAPITRE IV

LES ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DU DEVENIR DU PCP DANS LES SOLS : ESSAIS EN MICROCOSMES ET EN COLONNES DE SOL

Introduction

Un des objectifs principaux de ce travail était d'introduire les paramètres biologiques dans les modèles de devenir des produits chimiques dans les sols, modèles dans lesquels les aspects biotiques sont rarement pris en compte.

Ces paramètres biotiques consistent essentiellement dans l'estimation des capacités de biodégradation de la microflore indigène des sols ou d'une population adaptée introduite, ainsi que la localisation des ces microorganismes qui va déterminer, en fonction des mécanismes d'interaction avec le milieu poreux, les temps de contact microorganisme-xénobiotique qu'il faut estimer.

La prise en compte de la variation de ces différents paramètres au cours du temps en fonction de l'adaptation génétique et physiologique des cellules microbiennes ou des paramètres pédologique est également à considérer.

Dans tous les cas, la représentation mathématique des phénomènes de biodégradation ne pourra se faire qu'après avoir compris le fonctionnement biologique des sols : localisation, dynamique et structuration des populations, compétition, prédation, activités et cycles de dégradation ainsi que tout ce qui concerne l'écologie microbienne des sols.

Nous nous proposons donc dans ce chapitre de mettre en évidence le phénomène d'adaptation des microorganismes du sol par l'utilisation d'un dispositif d'enrichissement mis au point d'après tous les renseignements tirés de la littérature dans ce domaine.

Ceci permet à l'isolement de bactéries capables de dégrader le PCP, que nous utiliserons par la suite pour identifier et estimer les paramètres prépondérants intervenant dans les processus de biodégradation.

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer la biodégradation du PCP dans le sol, nous étudierons plus particulièrement la teneur en eau, la concentration en PCP, paramètres qui influencent également la dynamique des populations microbiennes et les processus de compétition entre organismes.

A/ ENRICHISSEMENT DU SOL EN MICROFLORE ADAPTEE ET ISOLEMENT DE BACTERIES DEGRADANT LE PCP

IV-1 Phase d'enrichissement du sol

IV-1-1 Conditions expérimentales

IV-1-1-1 Le dispositif d'enrichissement

Le dispositif d'enrichissement est présenté dans la figure IV-1; un élément de ce dispositif est schématisé dans la figure IV-2.

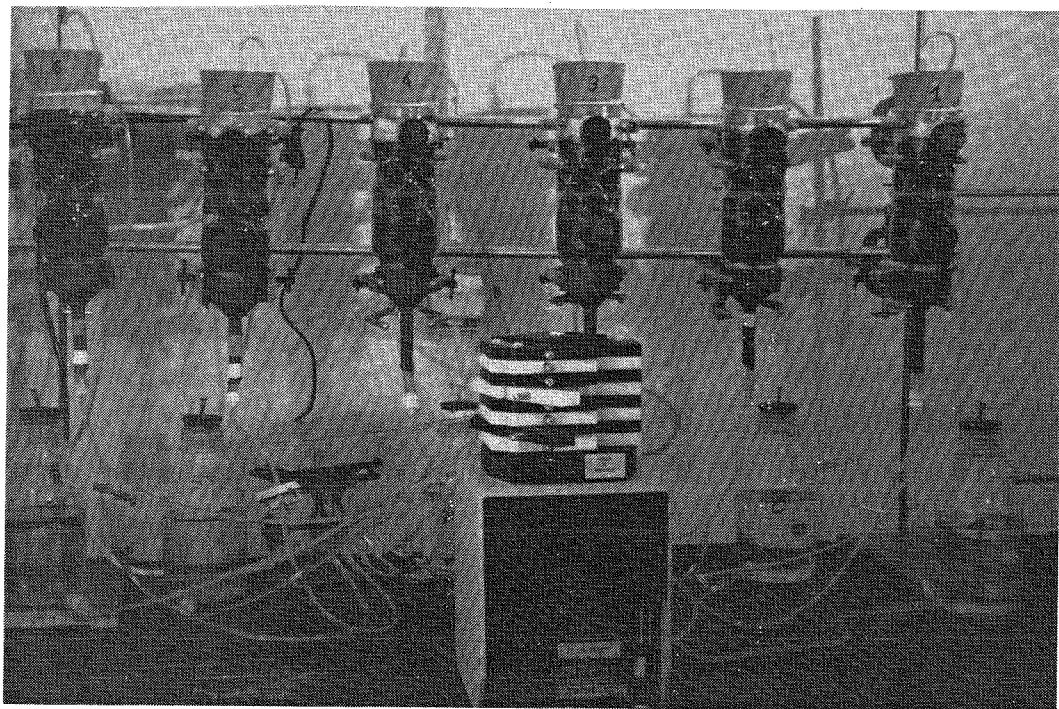


Figure IV-1 : Représentation du dispositif d'enrichissement

Le dispositif est constitué d'une batterie de 8 colonnes contenant chacune 250 g de sol frais humide, soit 176 g de sol équivalent poids sec, de 8 réservoirs dont 6 contiennent une solution aqueuse de 400 ml de PCP à 7,5 mg/l et 2 contiennent de l'eau (témoins). Une pompe multicanaux permet la circulation des solutions avec un débit de 100 ml/h. Un système d'aération constitué d'une pompe d'aquarium, d'un distributeur à 8 sorties et de vannes de réglage est inséré au dispositif. Le tout est installé dans une chambre noire climatisée.

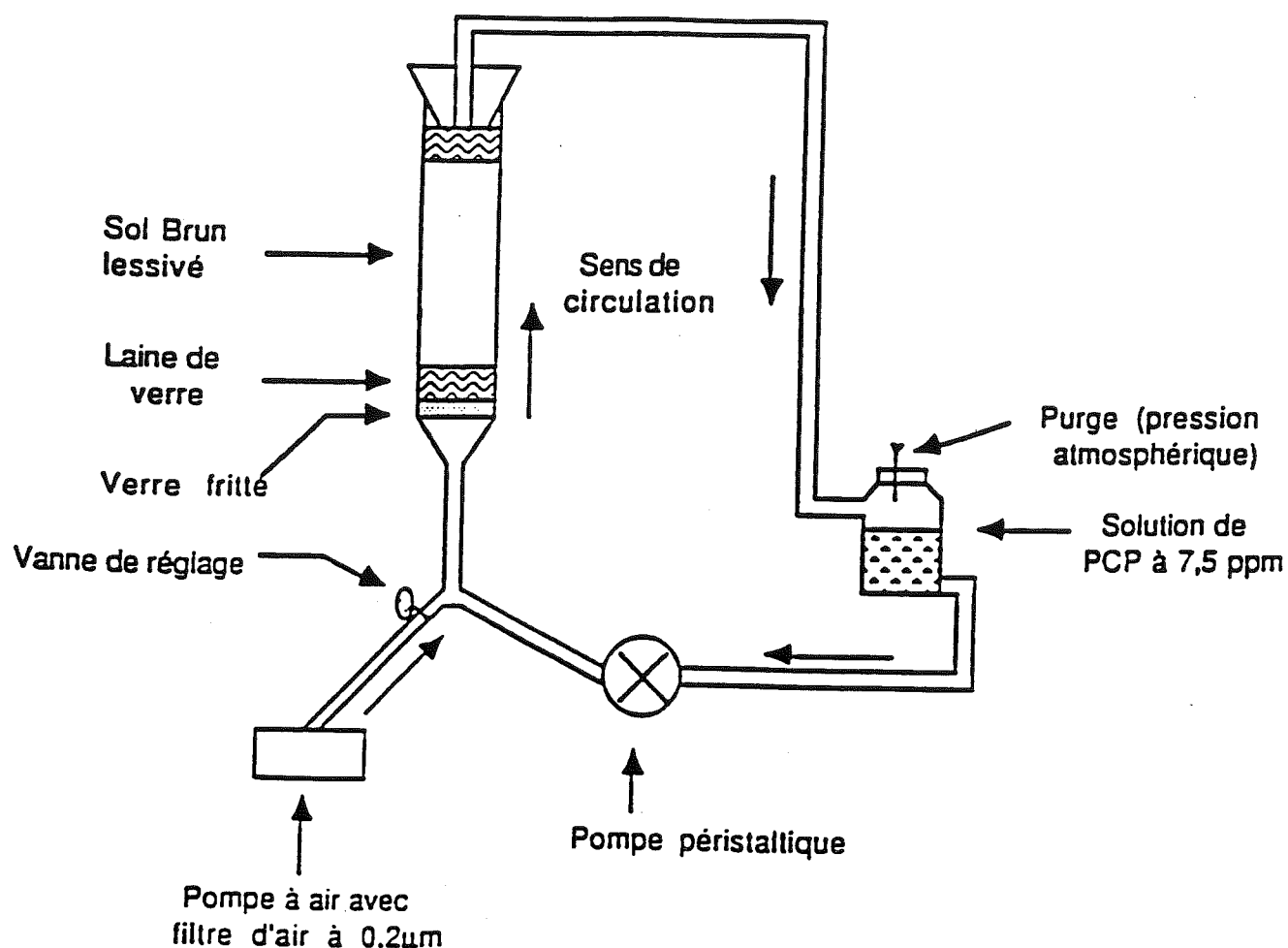


Figure IV-2 : Schéma d'un élément du dispositif d'enrichissement

IV-1-1-2 Fonctionnement du dispositif d'enrichissement

Le principe de fonctionnement du dispositif consiste à faire circuler la solution d'eau ou de PCP à travers le sol avec un bullage d'air régulier pendant 24 heures, et ce de bas en haut afin de limiter les problèmes de colmatage des colonnes.

Après 24 heures de circulation des solutions, les colonnes sont purgées de l'excès de solution par soutirage (inversion du sens de fonctionnement de la pompe) ; seul l'air continue de circuler pendant 24 heures dans les colonnes. Après cela, une addition de PCP à 7,5 mg/l est effectuée dans les réservoirs et la circulation des solutions est alors remise en route.

On effectue ainsi des alternances régulières de semi-anaérobiose (circulation des solutions) et d'aérobiose (circulation d'air). En plus de cette alternance eau-air, une variation de température est imposée : 25°C de 7 à 19 heures et 10°C de 19 à 7 heures. Tout le dispositif est maintenu constamment dans l'obscurité à cause de la sensibilité du PCP à la lumière.

IV-1-1-3 Les principaux paramètres suivis

a/ Suivi de la concentration en PCP

L'évolution de la concentration du PCP dans les réservoirs est suivie en effectuant des prélèvements de solution avant et après addition de PCP puis régulièrement au cours des 24h de circulation. Les échantillons sont alors analysés quantitativement par spectrophotométrie U.V. ou par CLHP.

b/ Suivi du carbone organique soluble et du pH de la solution du sol

Des mesures de carbone organique des solutions de percolation des sols ont été effectuées par le dosage de CO₂ dégagé lors d'une combustion à 1000°C en spectrophotométrie à infra rouge avec un appareil TOCAMASTER (Beckman industries) (service du Pr. Veron, Génie de l'Environnement, INSA-Lyon) permettant de suivre la stabilité de l'équilibre eau-sol et en particulier la concentration en acides humiques et fulviques extraits du sol.

c/ Suivi de la biomasse microbienne du sol

Les mesures de biomasse microbienne sont effectuées par la technique de fumigation-extraction (Amato & Ladd, 1988). Cette technique comporte trois étapes.

- Fumigation :

Des aliquotes de sol sont placées dans un dessicateur à vide saturé en vapeur de chloroforme (100 à 150 ml de CHCl₃ passé sur colonne d'alumine activée à 130°C). Les échantillons de sols sont incubés 10 jours à 28°C dans le dessicateur, la teneur en eau de l'atmosphère étant maintenue à la saturation par des feuilles de papier filtre imbibées d'eau distillée.

- Extraction :

Les produits de la lyse après 10 jours de fumigation sont extraits par 20 ml d'une solution de KCl 2M sous agitation pendant 30 minutes à 28°C. La suspension est filtrée sur membrane Millipore 0,45 µm et le filtrat conservé à -20°C en vue du dosage de l'azote.

L'extraction au KCl est également réalisée sur les échantillons de sol non fumigés qui serviront de témoins.

- Dosage :

L'azote réagissant à la ninhydrine (azote représentant les fonctions α-aminées et l'ammonium libéré par la protéolyse des organismes tués) est dosé à partir de la solution extraite au KCl.

Une aliquote de 1 ml est mélangée à 1 ml de réactif à la ninhydrine (ninhydrine 0,4 g, hydrindantine 0,06 g, méthycellosolve 15 ml, tampon acétate pH 5,5 5ml). Le mélange est placé 15 minutes dans un bain marie bouillant puis refroidi rapidement sous eau courante. Le volume de 13 ml d'éthanol 50% est ajouté et le tout mélangé par retournement du tube.

La suspension est dosée à 570 nm au spectrophotomètre. La quantité d'azote dans chaque échantillon (avant ou après fumigation) est déterminée à partir d'une gamme étalon contenant des quantités croissantes de leucine.

La différence des quantités réagissant à la ninhydrine ainsi mesurée est proportionnelle à la biomasse microbienne du sol. Conventiellement, les résultats sont exprimés en masse de carbone de la biomasse microbienne, en utilisant un facteur de conversion obtenu par étalonnage (Amato & Ladd 1988) :

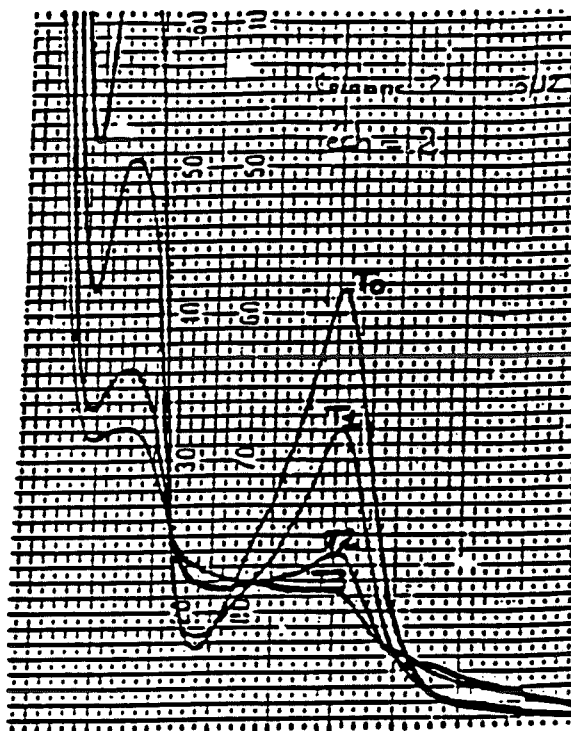
$$C \text{ (biomasse)} = \Delta N \text{ ninhydrine} \times 21$$

Les mesures de biomasse microbienne sont effectuées sur le sol en haut et en bas des colonnes après un mois de percolation (sur 2 colonnes) et après trois mois de percolation (sur 2 colonnes) et comparées aux valeurs obtenues sur le sol non percolé (sol initial) ou sur le sol percolé avec de l'eau.

IV-1-2 Résultats

IV-1-2-1 Suivi de la phase d'enrichissement du sol

Lors des premiers passages de PCP à travers le sol, le suivi de la concentration en PCP dans les réservoirs a été effectué (Figure IV-3). On a pu ainsi tracer une cinétique de disparition du PCP au cours du temps (Figure IV-4) où l'on voit que la totalité du PCP introduit disparaît en moins de 24 heures.



T0 =	0	= 7,5 mg/l
T1 =	1h00	= 4,5 "
T2 =	3h00	= 1,6 "
T3 =	6h00	= 0,8 "

Figure IV-3 : Evolution des spectres U.V. de la solution de PCP au cours du temps

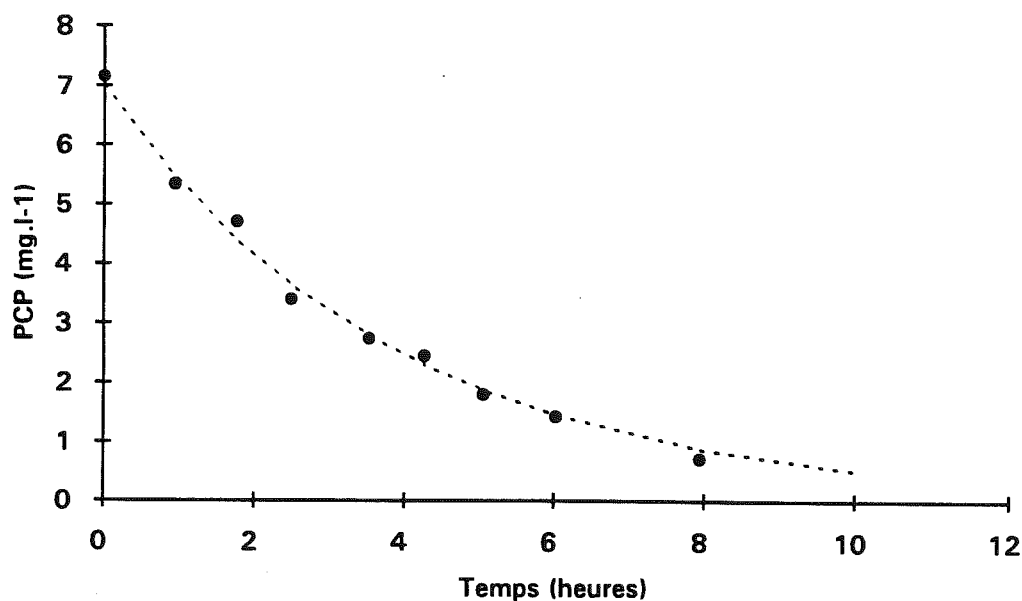


Figure IV-5 : Cinétique de disparition du PCP dans les réservoirs

C'est ce résultat qui nous a dicté le protocole d'addition de PCP à suivre car on n'avait aucune idée de la vitesse de fixation du PCP dans ce sol. Par la suite, des cinétiques similaires ont été effectuées régulièrement, et on n'a noté aucune variation de la forme de la courbe au cours du temps, ce qui signifie que l'on a pas saturé tous les sites de fixation du sol. La forme des cinétiques de disparition est celle d'une exponentielle décroissante correspondant à l'équation :

$$[\text{PCP}] = 7,2 e^{-0,26 t}$$

avec : $[\text{PCP}]$ exprimée en mg.l^{-1} et t en h.

Le facteur 0,26 correspondant au rapport débit/volume, on peut en conclure que cette cinétique de disparition du PCP correspond à la dilution de la solution de PCP par l'eau de percolation du sol (circuit fermé), ce qui signifie que la totalité du PCP est retenue par le sol.

- Le suivi du pH des solutions de percolation a été effectué avec un pHmètre au cours de l'enrichissement. Ce pH a atteint une valeur d'environ 6,5 après mise en équilibre de la colonne de sol et a très peu fluctué durant

la période d'enrichissement. Ce pH correspond approximativement au pH eau du sol en conditions naturelles.

- Le suivi du carbone organique soluble des solutions de percolation a également été effectué, mais seulement sur une période d'un mois. Après mise en équilibre de la solution aqueuse avec des colonnes témoins, des prélèvements ont été effectués chaque semaine et dosés : la teneur initiale en carbone organique était de 32 mg/l et les valeurs suivantes fluctuaient entre 32 et 25 mg/l suivant que les prélèvements étaient effectués au début ou à la fin d'un cycle de circulation d'eau dans les colonnes.

Les quantités de PCP introduites dans les colonnes sont représentées dans le tableau suivant :

Colonnes (par 2)	Nombre d'additions de PCP	Quantité de PCP introduite	Durée de l'enrichissement (mois)
1 ^o Série	6	0,102	1
2 ^o Série	30	0,51	3

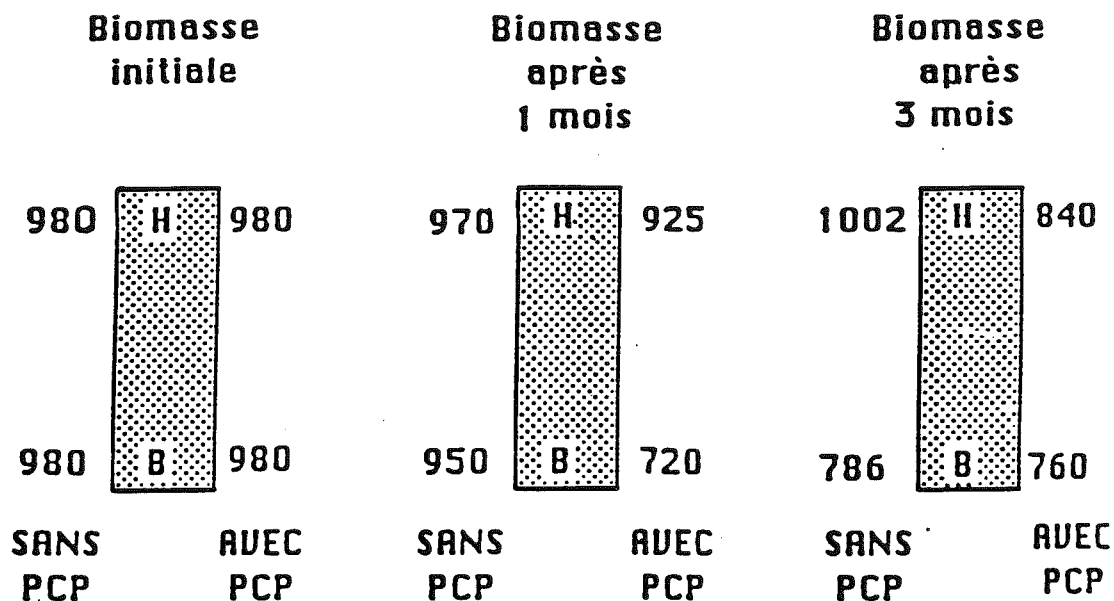
Tableau IV-1 : Caractéristiques des essais sur les colonnes de sol utilisées par l'enrichissement

IV-1-2-2 Effet du PCP sur la biomasse microbienne

L'évolution de la biomasse microbienne au cours de l'enrichissement a été suivie par des mesures sur la première et la seconde série de colonnes, (1 mois et 3 mois d'enrichissement) sur le haut et le bas de ces colonnes (Figure IV-5).

Des mesures ont également été effectuées sur les témoins correspondants. Les résultats obtenus montrent qu'après un mois de percolation avec de l'eau, la biomasse du sol n'a pas évolué, ni en haut ni en bas de la colonne, contrairement aux colonnes percolées avec le PCP où la biomasse du bas de colonne (entrée du PCP) a baissé de 26 %.

Après 3 mois de percolation avec de l'eau, la biomasse du bas de colonne a baissé de 20% pour se retrouver au même taux que la colonne percolée avec du PCP au même stade d'enrichissement.



Les valeurs numériques sont les moyennes des résultats obtenus sur 2 colonnes
(μg de C.g⁻¹ de sol sec)

Figure IV-5 : Evolution de la biomasse microbienne au cours de l'enrichissement

IV-1-3 Discussion

Nous avons pu voir dans la littérature que le protocole d'enrichissement pouvait avoir un effet important sur le type d'évolution intervenant au cours de cette phase, en particulier le mode d'oxygénation influe sur les réactions de dégradation. C'est pour cette raison que nous avons effectué une alternance de phases d'oxygénation et de semi-anaérobiose.

Le suivi du pH et du carbone soluble des solutions de percolation montre que le système utilisé est relativement stable au cours du temps et en tout cas qu'il n'y a pas de variations importantes des propriétés du sol. Les changements sont plutôt d'ordre physico-chimiques : on a constaté visuellement une désagrégation et un entraînement de particules fines vers le haut des colonnes.

Les résultats relatifs à la variation de la concentration en PCP montrent que celui-ci est très rapidement retenu par le sol, et que malgré la quantité importante de produit ajouté, on ne le voit pas ressortir.

Le taux assez élevé de matière organique du sol (environ 10 %) semble en être la cause puisque, comme nous avons pu le voir au chapitre II, le taux d'adsorption du PCP est proportionnel au taux de carbone organique du sol (Lee et al. 1990 ; Choi & Aomine 1973).

Tout au long de la phase d'enrichissement, aucun produit de dégradation n'a pu être détecté en spectrophotométrie UV ou en CLHP, ce qui n'est pas étonnant compte-tenu du taux de rétention du produit initial et des intermédiaires de dégradation probables (Tétrachlorophénols, non détectables par U.V., dans nos conditions).

Par ailleurs, dans les conditions utilisées, la biodégradation n'a pu être mise en évidence car il est impossible de déterminer le processus physique, chimique ou biologique responsable de la disparition du PCP. Des études de thermodésorption du PCP du sol enrichi ont permis de mettre en évidence la présence de PCP adsorbé en grande quantité, montrant ainsi que le PCP n'a pas été totalement éliminé du sol.

Les mesures de biomasse microbienne, malgré certaines variations obtenues entre les colonnes d'une même série, indiquent une tendance décroissante des teneurs en microorganismes au moins sur le bas des colonnes qui correspond au niveau d'entrée du PCP.

Ainsi le PCP aurait une certaine toxicité vis à vis de la biomasse microbienne ce qui semble être en contradiction apparente avec la littérature où des effets toxiques de ce produit ne sont décrits qu'avec des concentrations de l'ordre de 2000 mg.l⁻¹ (Alexander 1977).

Nous avons vu cependant, qu'après trois mois de percolation, 510mg de PCP.g⁻¹ de sol sec ont été ajoutés : en supposant que le PCP soit dans la phase aqueuse adsorbée (environ 0,4 ml.g⁻¹ de sol sec), on aurait des concentrations maximales de l'ordre de 1500 mg.l⁻¹, du même ordre de grandeur que la concentration toxique. Ceci pourrait donc expliquer la diminution de biomasse observée. La diminution de biomasse dans le bas de la colonne témoin percolée 3 mois avec de l'eau pure semble toutefois indiquer que la décroissance des populations microbiennes dans la zone d'entrée de l'eau pourrait aussi s'expliquer en partie par une évolution verticale de la biomasse vers le haut de la colonne de sol suivant le sens de

migration de l'eau. Ceci est en accord avec les résultats observés par Van Elsas et al. (1991) et Worral & Roughley (1991).

La phase d'enrichissement a mis en évidence le peu d'effet que le PCP semble avoir sur la microflore de ce sol : il n'y a pas d'effet de toxicité très évident du PCP, sans doute parce qu'en présence des composés organiques très abondants dans ce sol, son action sur la microflore est très limitée.

De même, son utilisation par les microorganismes du sol doit être limitée à cause de sa faible concentration par rapport au carbone organique disponible dans ce sol. Certains auteurs ont montré que la présence en forte concentration d'un cosubstrat carboné inhibait partiellement ou complètement la biodégradation des pesticides (Schmidt 1987, Wiggins & Alexander 1988, Topp 1988, Swindoll et al. 1988).

IV-2 Mise en évidence de l'enrichissement du sol en microorganismes adaptés.

IV-2-1 Sélection et isolement de microorganismes adaptés à la dégradation du PCP.

IV-2-1-1 Conditions expérimentales

a/ Les milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la sélection de microorganismes dégradant le PCP est un milieu minéral modifié de Saber et al (1985). Il est faiblement tamponné à pH 7 et sa composition de base est la suivante :

- K_2HPO_4	85 mg	- $CaSO_4$	30 mg
- KH_2PO_4	17 mg	- $MnSO_4$	30 mg
- $MgSO_4$	30 mg	- $(NH_4)_2SO_4$	17 mg
- $FeSO_4$	30 mg	- Q.S.P.	1 litre d'eau distillée

Par commodité, ce milieu est appelé MSX (pour milieu de sélection avec xénobiotique). A partir de ce milieu de base, 4 autres milieux ont été préparés :

- MSX 7,5 contenant $7,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de PCP (C/N = 1,1)
- MSX 10 contenant 10 mg.l^{-1} de PCP (C/N = 1,3)
- MSX 50 contenant 50 mg.l^{-1} de PCP (C/N = 6,7)
- MSX G contenant 35 mg.l^{-1} de glucose (C/N = 7,8)

Tous ces milieux contiennent en plus 16 mg.l^{-1} d'un indicateur coloré: le pourpre de bromocrésol (BCP) virant du pourpre au jaune entre pH 6,8 et pH 5,2.

Les milieux solides correspondants sont obtenus par addition d'agar noble (ultra pur) à 15 g.l^{-1} aux milieux liquides précédents.

Le milieu riche liquide utilisé est le milieu LB (Luria Broth) contenant :

- 5 g.l^{-1} d'extrait de levure,
- 10 g.l^{-1} de bactopeptone
- $8,5 \text{ g.l}^{-1}$ de NaCl,

le pH est ajusté à 7,3. Ce milieu est utilisé pour préparer les inoculums bactériens. Le milieu solide utilisé est obtenu par addition d'agar (15 g.l^{-1}) (DIFCO).

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 mn et le glucose est ajouté ultérieurement après filtration stérilisante à 0,2 mm.

b/ Mode opératoire

La technique de sélection consiste à étaler une suspension de microorganismes extraits du sol par agitation au vortex dans de l'eau distillée stérile sur un milieu gélosé de sélection spécifique (MSX). Le milieu contient le xénobiotique comme seule source de carbone et d'énergie. Les incubations sont menées à 28°C pendant plusieurs jours. La sélection des colonies supposées aptes à dégrader le PCP s'effectue directement sur les boîtes de Petri par visualisation d'un halo jaune autour de ces colonies. Ce halo jaune est dû à la libération d'HCl au cours de la dégradation du PCP,

entraînant une acidification locale et le virage de l'indicateur coloré présent dans le milieu.

La sélection de microorganismes est effectuée sur le sol initial non enrichi et sur le sol percolé par le PCP après un mois et après trois mois d'enrichissement.

Le repiquage des colonies ainsi sélectionnées, sur le même milieu de sélection permet l'isolement et la purification de microorganismes par la technique des stries d'épuisement.

IV-2-1-2 Caractérisation des souches bactériennes sélectionnées

a/ Détermination des grams

Le gram des bactéries est un paramètre qui permet leur classification en fonction de la structure de leur paroi et de son fonctionnement. Les grams des souches sont déterminées par la technique de Suslow et al. (1982).

Après culture sur gélose nutritive, une fraction de la biomasse produite est mélangée sur une lame de verre à une goutte de potasse 3M préparée extemporanément. L'étirement du mélange par une öse, permet de déterminer le gram de la souche : gram négatif s'il y a formation d'un fil et gram positif dans le cas contraire.

Une souche de *Xanthomonas* a été utilisée comme témoin de bactérie à gram négatif.

b/ Etude morphologique

Une étude morphologique a été effectuée au microscope photonique (1200) sur des préparations vitales des microorganismes isolés.

c/ Identification des souches

L'identification des souches isolées a été effectuée sur galerie API 20 NE (non Enterobactéries) à partir du catalogue analytique correspondant. Le choix de ces galeries est dû au fait que des essais préalables sur galerie API 20 E (Enterobactéries) n'ont pas été efficaces.

d/ Profils plasmidiques des souches

L'analyse plasmidique des souches est effectuée par électrophorèse sur gel par la technique d'Eckardt (1978) modifiée par Casse (1979). Des profils plasmidiques sont effectués par digestion des cellules directement dans les puits d'un gel d'agarose à 7 %. Après migration à 50 volts pendant une demi-heure et à 110 volts pendant 3 heures, les plasmides sont révélés par incubation dans du bromure d'éthidium pendant 30 minutes (Annexe 5).

IV-2-1-3 Résultats

a/ Obtention des bactéries adaptées

Les microorganismes ont été extraits du sol par agitation dans l'eau puis étalés sur le milieu de sélection. Après un repiquage sur ce milieu, une trentaine de colonies ont été sélectionnées par la formation d'un halo d'acidification du milieu.

Parmi ces souches, 4 ont été isolées et purifiées par la suite. Les 4 souches ont été nommées comme leur sol d'origine C2, C3, C4 et SI pour colonnes 2, 3, 4 et sol initial. Les souches C2 et C4 ont été sélectionnées à partir du sol enrichi pendant 3 mois alors que la souche C3 provient du sol enrichi pendant 1 mois.

b/ Caractéristiques morphologiques et physiologiques

L'observation de préparation vitales des souches au microscope photonique (x1200) a permis de constater que les 4 souches avaient une morphologie assez variée. Les souches C2 et C3 se présentent sous forme de petits bâtonnets de 1 à 2 μm de long et les colonies correspondantes ont un aspect blanchâtre sur gélose.

La souche C4 se présente sous la forme d'un bâtonnet de taille moyenne : 3 à 4 μm , les colonies ont également un aspect blanchâtre et dégagent une forte odeur de terre. La souche SI a la forme d'un long bâtonnet de 5 à 6 μm de long et les colonies ont un aspect blanc rosé. Les grams des 4 souches ont également été déterminés, il s'avère qu'elles sont toutes les quatre à gram négatif. Aucune des quatre souches n'est mobile ni ne possède de flagelle ou de capsule.

c/ Caractérisation plasmidique

Une analyse plasmidique des 4 souches a été effectuée sur gel d'agarose 0,7 % avec une souche témoin d'*Escherichia coli* V517 portant 8 plasmides de tailles connues (Macrina et al. 1978) : 1,3 ; 1,65 ; 1,86 ; 2,4 ; 3,2 ; 3,6 ; 5 et 34 MDa. Un plasmide a été mis en évidence seulement chez la souche isolée à partir du sol non enrichi (SI), et ce plasmide a une taille comprise entre 43 et 48 MDa. (figure IV-6).

Seuls les 5 plus gros plasmides de la souche d'*E. coli* sont visibles sur cette figure, les 3 plus petits étant sortis du gel. L'étalonnage n'a donc été effectué qu'avec 5 points.

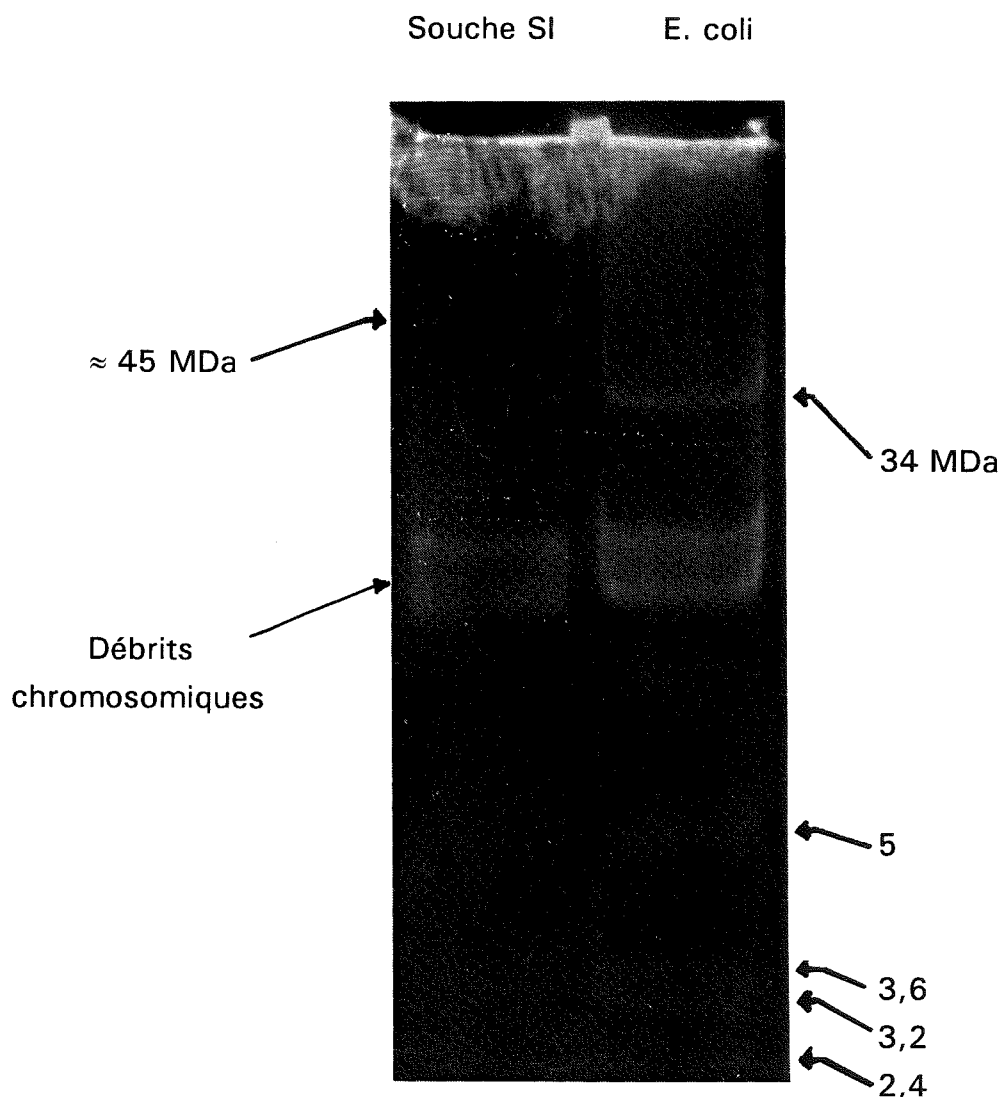


Figure IV-6 : Profil plasmidique de la souche SI

d/ Identification des souches

L'utilisation des galeries API 20 NE a permis d'identifier les souches au niveau du genre : les souches C2 et C3 sont des *Acinetobacter* alors que les souches C4 et SI sont des *Pseudomonas*. Une identification plus précise de la souche C2 a été demandée à l'Institut Pasteur, confirmant le résultat obtenu précédemment : la souche C2 est un *Acinetobacter calcoaceticus* (Galerie API 50).

e/ Evaluation des capacités cataboliques des souches isolées.

Des tests de dégradation ont été effectués sur des milieux solides spécifiques et l'aptitude des souches isolées à dégrader le PCP a été testée par des cinétiques de dégradation du xénobiotique en milieu liquide aéré et agité à 28°C. Le milieu de sélection MSX contenant le PCP est ensemencé avec les souches isolées, sans préculture en milieu complet. Des échantillons sont prélevés au cours du temps d'incubation et 3 paramètres sont évalués :

- la croissance bactérienne par mesure de la densité optique à 540 nm
- la libération d'ions chlorures dans le milieu de culture par rapport à un témoin non ensemencé par addition de nitrate d'argent (non quantitatif)
- la disparition du PCP dans le milieu de culture par spectrophotométrie UV et CLHP.

1/ Tests sur boîte

L'évaluation des capacités cataboliques des souches pour le PCP a été menée dans un premier temps sur milieu gélosé (figure IV-7) : on a vérifié d'abord que la croissance et l'acidification sur le milieu de sélection solide n'étaient pas dues à la dégradation de l'indicateur coloré (BCP) qui est une molécule contenant plusieurs cycles aromatiques bromés.

Pour cela, les 4 souches ont été repiquées sur le milieu MSX 7,5 sans indicateur coloré et sur le milieu MSX avec le BCP. Dans le premier cas, une croissance a été observée et dans le second cas, aucune acidification n'est apparue ce qui montre bien que le BCP n'est pas dégradé.

Nous avons ensuite vérifié que le halo d'acidification était bien dû à la dégradation du PCP et pas à un métabolisme secondaire, pour cela les quatre souches ont été repiquées sur le milieu MSX contenant du glucose. On a alors observé une croissance bactérienne mais pas l'acidification du milieu (figure IV-7a).

Sur le milieu MSX 7,5 contenant du glucose, on a pu constater une croissance et une acidification accélérées des quatre souches suggérant la possibilité d'une dégradation du PCP par cométabolisme, l'énergie étant alors tirée du glucose (figure IV-7b).

Un dernier test a été effectué sur le milieu de sélection contenant 50 mg/l de PCP. Dans ce cas, on note une croissance et une acidification faibles et seulement après trois ou quatre jours d'incubation à 28°C (figure IV-7c).

Nous avons constaté en outre qu'une des quatre souches isolées : la souche SI, était incapable de croître et d'acidifier le milieu lorsqu'elle était incubée à 37°C. (figure IV-7d).

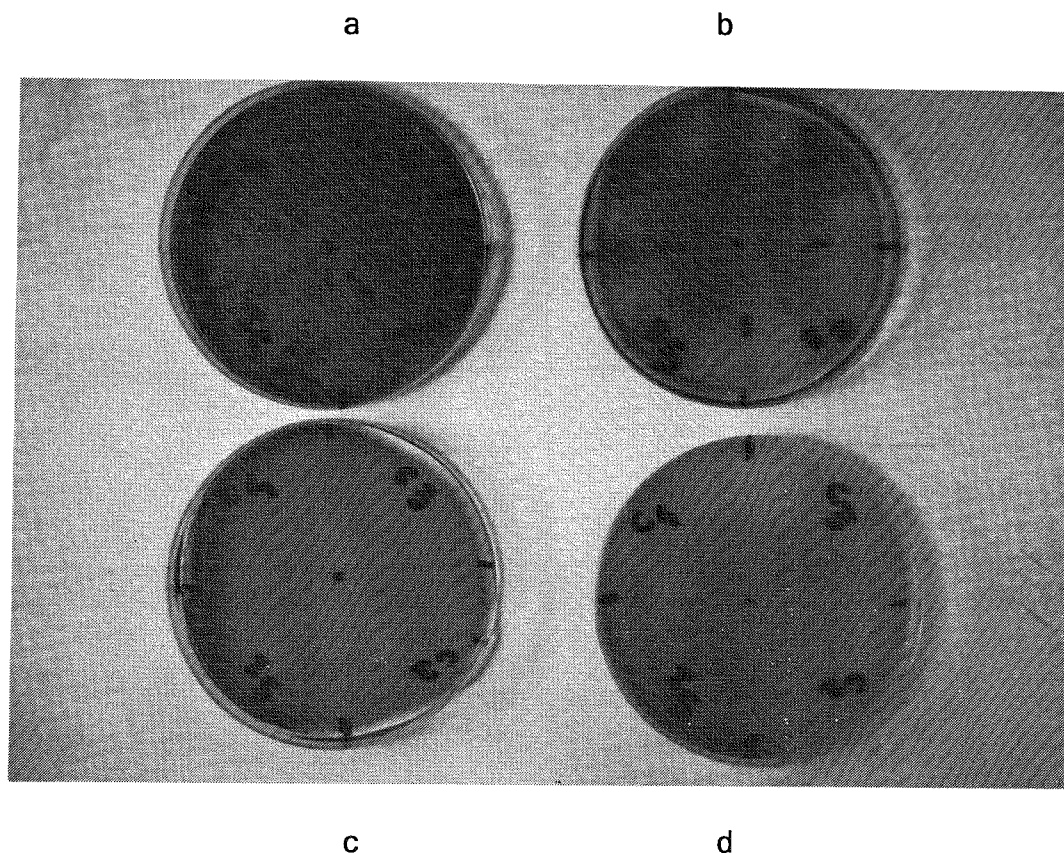


Figure IV-7 : Tests de dégradation en milieu solide

2/ Tests en milieu liquide

Une cinétique de dégradation a été effectuée sur le milieu de sélection liquide pendant 26 jours (Figure IV-8) et trois paramètres ont été suivis au cours de cette cinétique de croissance (Tableau IV-2). On a ainsi pu constater que les souches C2 et C3 semblaient avoir le même taux de dégradation et de croissance. La libération d'ions chlorures dans le milieu de culture confirme la dégradation du PCP, même si les résultats obtenus pour les souches SI et C4 semblent montrer une faible activité catabolique en milieu liquide : faible croissance et faible taux de dégradation.

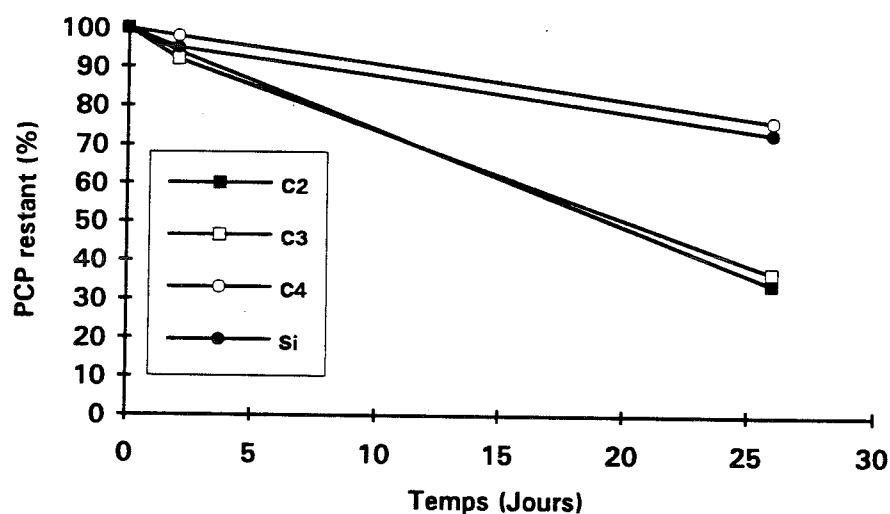


Figure IV-8: Cinétique de dégradation du PCP en milieu liquide

Souche	Croissance (a)	Dégradation du PCP% (b)	Libération d'ions chlorures (c)
C2	+	66	+
C3	+	63	+
C4	-	30	+
SI	+-	27	+

Résultats obtenus après 26 jours d'incubation à 28°C en milieu MSX liquide.

(a) : Mesure de la densité optique à 540 nm

(b) : Dosage par HPLC

(c) : Addition de AgNO₃

Tableau IV-2: Mise en évidence de la dégradation du PCP par les souches sélectionnées en milieu liquide.

Il semble donc que deux souches bactériennes issues d'un sol enrichi pendant des périodes différentes ont les mêmes capacités de dégradation (C2 et C3) alors que les souches C2 et C4 ont des capacités différentes.

IV-2-2 Evolution des populations adaptées au cours de l'enrichissement

IV-2-2-1 Obtention d'un marquage spécifique des souches sélectionnées

Un des objectifs du travail était de réintroduire une des souches isolées dans le sol. Cela nécessite d'avoir une technique permettant de suivre et quantifier la souche introduite. De plus, il fallait pouvoir estimer l'évolution des populations dégradantes au cours de l'enrichissement, un marquage spécifique des 4 souches a donc été nécessaire.

Nous avons choisi d'utiliser la technique d'immunofluorescence indirecte qui consiste à obtenir des anticorps spécifiques d'un antigène de chacune des souches et à révéler ces anticorps par d'autres anticorps portant une molécule d'isothiocyanate de fluorescéine.

a/ Technique de préparation des sérums antibactériens

La technique de préparation a été décrite par Josserand (1983). Les sérums antibactériens utilisés pour le marquage spécifique des souches isolées sont préparés par des injections régulières à un lapin de 2 ml d'une suspension bactérienne lavée et traitée à la vapeur d'eau (100°C) pour éliminer les antigènes flagellaires (non spécifiques). Le titre du sérum est déterminé en cours de préparation, et lorsqu'il atteint une valeur suffisamment élevée (efficace à une dilution au 1/1000 et plus), le sérum est prélevé sur le lapin par ponction cardiaque.

b/ Technique de dénombrement par immunofluorescence indirecte (Steinberg 1989).

Cette technique est basée sur la révélation du complexe antigène bactérien-anticorps par un fluorochrome : l'isothiocyanate de fluoresceine. Cette technique peut être utilisée sur lame microprint ou sur filtre et à

partir d'une culture pure de cellules (pour le titre du sérum) ou d'un extrait de sol (pour les dénombrements) (annexe 6).

L'extrait de sol est obtenu par dispersion d'environ 10 g du sol pendant 2 mn dans 100 ml d'eau ou de NaCl 0,85% (technique de Crozat, 1984) au Waring blender. Le sol est ensuite floculé par addition d'1 g d'un mélange Ca(OH)_2 / MgCO_3 (2/5) pendant 10 mn.

Sur la lame microprint, on dépose 25 ml de la suspension bactérienne à différentes dilutions sur les empreintes circulaires de la lame. Après séchage et fixation dans l'acétone pendant 5 mn, on dépose 25 ml de sérum antibactérien dilué sur chaque empreinte. Les lames sont alors incubées 30 mn à température ambiante.

Après lavage au NaCl 0,8 % et à l'eau, les lames sont séchées et 25 ml de sérum de chèvre anti IgG de lapin (Institut Pasteur) marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine (dilué au 1/100) sont déposés sur chaque empreinte. Après 30 mn d'incubation à température ambiante et des lavages à l'eau et au NaCl 0,8 %, les lames sont séchées puis montées dans la glycérine tamponnée et observées au microscope Zeiss Universal inversé à épifluorescence (x 1200).

Après détermination approximative de la concentration de la suspension bactérienne, le dénombrement précis est effectué sur filtre en déposant le nombre de bactéries suffisant pour obtenir environ 5 bactéries par champ d'observation. Le protocole de marquage est exactement le même à l'exception de la fixation à l'acétone qui est éliminée.

De plus, un contrastant peut être utilisé : la gélatine-rhodamine, avant le dépôt des sérums sur les lames ou les filtres.

c/ Technique du dénombrement de la microflore totale du sol

Le dénombrement de la microflore totale est effectué grâce à l'utilisation d'un colorant non spécifique.

La technique consiste à faire agir ce colorant (l'acridine orange), sur une dilution de la suspension de sol obtenue précédemment mais avant floculation selon la technique décrite par Ramsay (1983).

Cela permet de colorer de manière non spécifique les cellules de la population totale du sol qui apparaissent vertes.

De même que pour l'immunofluorescence indirecte, on utilise des lames microprint ou des filtres. Après coloration et montage dans la glycérine tamponnée (pour les lames), les cellules sont dénombrées au microscope à épifluorescence (x1200).

d/ Numération des cellules

Après la préparation des lames microprint ou des filtres, les cellules sont dénombrées sous le microcosme à épifluorescence.

Les résultats des dénombrements sont alors convertis en nombre de bactéries recherchées par g de sol par la formule :

$$N = n \cdot \frac{S \cdot d \cdot V}{s \cdot D \cdot m}$$

- ou
- N = nombre de bactéries par gramme de sol sec
 - n = nombre moyen de bactéries par champ de microcosme
 - S = surface de filtration (201,062 mm²)
 - s = surface d'un champ de microscope (22,686. 10⁻³ mm²)
 - d = facteur de dilution
 - D = volume de surnageant filtré (ml)
 - V = volume d'extraction (100 ml + eau du sol)
 - m = masse de sol sec de l'échantillon (g)

La précision des dénombrements ainsi obtenus peut être estimée en supposant que la distribution des bactéries sur le support suit une loi de Poisson. Dans ce cas, la précision est fonction uniquement du nombre total de cellules recensées et non pas du nombre de champs de microscope observés.

La table de Johnson et Kotz donne la limite inférieure (L) et supérieure (U) de chaque estimation en fonction du nombre de cellules dénombrées (annexe 7).

On obtient ainsi un encadrement de la valeur déterminée précédemment par :

$$LN < N < UN$$

La comparaison entre deux valeurs s'effectue par la relation statistique (Cleyet-Marel & Chessel 1984) :

$$\Delta = \frac{(N_1 - N_2)^2}{N_1 + N_2}$$

que l'on compare à un χ^2 à 1 degré de liberté.

IV.2.2.2 Vérification de la spécificité des sérums

Des immunosérums ont été obtenus à partir des 4 souches isolées. Un test sur lame microprint a été effectué pour déterminer la dilution de sérum permettant de marquer correctement la souche homologue sans qu'il y ait trop de réactions croisées avec d'autres souches (Annexe 8). Pour les souches C2, C3 et SI, une dilution au 1/640 du sérum correspondant convient, tandis que pour la souche C4, le titre du sérum est plus faible et il faut utiliser une dilution de sérum au 1/320 malgré les réactions croisées observées.

IV.2.2.3 Evolution de la taille des populations dégradantes

L'évolution de la taille de la population des souches C2, C3 et SI a été estimée par des dénombrements par immunofluorescence indirecte sur le sol témoin et sur le sol enrichi, percolés pendant 3 mois. Les résultats obtenus pour la souche C4 n'ont pas été présentés à cause des réactions croisées observées avec la microflore indigène du sol qui ont faussé les résultats. La coloration bactérienne directe (Acridine orange) a permis d'évaluer la microflore totale. On a ainsi déterminé l'abondance relative des souches sélectionnées dans le sol témoin et dans le sol enrichi pendant 3 mois (Tableau IV-3).

On constate que les variations sont relativement faibles et qu'en tout cas elles ne sont pas supérieures à un facteur 3, ce qui ne semble pas significatif compte-tenu des pertes possibles lors des extractions du sol au Waring Blender.

Il apparaît donc qu'après une phase d'enrichissement du sol de 3 mois, les populations des souches sélectionnées n'ont pas évolué quantitativement de manière significative.

Souches	Sol témoin	Sol enrichi
SI	1,1	0,6
C2	1,5	2,4
C3	2,4	0,8

Résultats obtenus sur du sol percolé pendant 3 mois avec de l'eau (témoin) ou du PCP (enrichi).

Les résultats sont exprimés sous forme de rapport de la population sélectionnée à la population totale ($\times 10^{-3}$).

Tableau IV-3 : Evolution de l'abondance relative de 3 souches adaptées pendant l'enrichissement

IV-2-3 Discussion

IV-2-3-1 La sélection de bactéries adaptées.

Le choix de la sélection de bactéries plutôt que de champignons a été déterminé par les études prévues dans la suite de ces expérimentations à savoir des réintroductions de microorganismes en milieu sol.

La technique de sélection employée peut porter à discussion du fait qu'elle favorise certainement la croissance d'un type particulier de microorganismes aux dépens d'autres dont on ignore absolument les compétences. En particulier, le choix d'un milieu minéral, plutôt qu'un milieu plus riche a certainement entraîné l'élimination de microorganismes auxotrophes (Herbert 1982).

De même, la technique employée pour l'extraction des microorganismes a pu favoriser la sélection de bactéries libres ou du moins en position externe dans le sol. Cependant, un des objectifs de départ était justement d'obtenir des microorganismes ayant été en contact direct avec les solutions chargées en PCP dans le sol.

L'agitation dans l'eau, utilisée pour obtenir les microorganismes à sélectionner, a permis d'extraire les plus dispersables et surtout ceux ayant été le plus souvent au contact des composés véhiculés par l'eau.

L'étude des 4 souches bactériennes isolées au cours de cette étude n'a pas permis de mettre en évidence un quelconque facteur d'adaptation, comme par exemple la présence d'un plasmide commun chez les différentes souches. Par la technique utilisée, on constate que seule la

souche SI possède un plasmide. De plus, le fait que cette souche SI qui a été isolée du sol non enrichi possède des capacités cataboliques (même faibles), ne nous permet pas d'affirmer qu'il y a eu adaptation par transfert d'éléments génétiques extrachromosomiques pour les trois autres souches isolées après l'enrichissement. Il est possible cependant que l'adaptation ait eu lieu sans acquisition d'éléments génétiques (microévolution, induction enzymatique, cométabolisme), ce qui la rend encore plus difficile à mettre en évidence.

Une technique différente doit être utilisée pour visualiser d'éventuels plasmides qui n'a pas été mis en évidence par la technique d'Eckardt. Par ailleurs, l'absence de plasmides chez les souches du sol enrichi peut provenir également du choix de la phase de croissance au cours de laquelle les cellules ont été prélevées, qui est parfois déterminante non seulement dans l'abondance relative d'un plasmide, mais aussi dans les caractéristiques de lyse des cellules (Givaudan 1991).

Ces tests de dégradation du PCP par les souches isolées ont permis de montrer qu'elles étaient efficaces aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide mais à des niveaux différents pour les 4 souches, même si aucun produit de dégradation n'a été mis en évidence. La souche la plus efficace (C2) a été identifiée comme étant une souche d'*Acinetobacter calcoaceticus*. Les souches C3, C4 et SI appartiennent pour la première au genre *Acinetobacter* et pour les 2 autres au genre *Pseudomonas*. Ce sont des genres bactériens couramment rencontrés dans les études de dégradation de xénobiotiques (Chakrabarty, 1986).

IV-2-3-2 Marquage des souches isolées

Les immunosérums obtenus pour les quatre souches sont assez spécifiques en immunofluorescence indirecte.

Ce marquage spécifique a donc été utilisé pour une étude sur l'abondance relative de 3 des 4 souches sur le sol percolé pendant 3 mois avec du PCP et sur son témoin. Cette expérimentation n'a pas permis de mettre en évidence un enrichissement au sens propre du terme c'est à dire une augmentation de la population bactérienne marquée par rapport à la population totale dans le sol, ceci ne signifie pas pour autant qu'il n'y ait

pas eu d'adaptation, car celle ci peut également correspondre à une augmentation d'activité sans entraîner de croissance cellulaire (Spain & Van Veld 1983).

Les résultats obtenus lors de l'évaluation des capacités cataboliques en milieux solide et liquide, ont pourtant permis de montrer que la dégradation du PCP *in vitro* s'accompagnait d'une croissance cellulaire.

Il est cependant difficile de conclure car le comportement des microorganismes en laboratoire sur milieu minimum est loin d'être le même que celui observé dans le sol où du carbone organique facilement utilisable est toujours disponible et peut orienter la dégradation du PCP dans le sol vers le processus de cométabolisme qui permet d'obtenir de l'énergie ou du carbone à partir d'autres substrats carbonés (Alexander 1981).

B/ CHOIX ET COMPORTEMENT DANS LE SOL D'UN MICROORGANISME COMPETENT POUR LA DEGRADATION DU PCP

IV-1 Le microorganisme modèle

IV-1-1 Choix du microorganisme modèle

Des contraintes d'organisation du travail entre deux laboratoires ont momentanément conduit à l'arrêt des travaux menés à Lyon. Les souches isolées ont donc été mises en conservation au congélateur à -20°C dans un milieu de culture liquide avec du glycérol à 50 %.

Après 10 mois de conservation, les souches ont été ressorties du congélateur, et leurs aptitudes cataboliques vis à vis du PCP ont été testées selon le protocole décrit précédemment mais avec un inoculum bactérien plus important (environ 10^8 bactéries ml^{-1}) (Fig. IV-9).

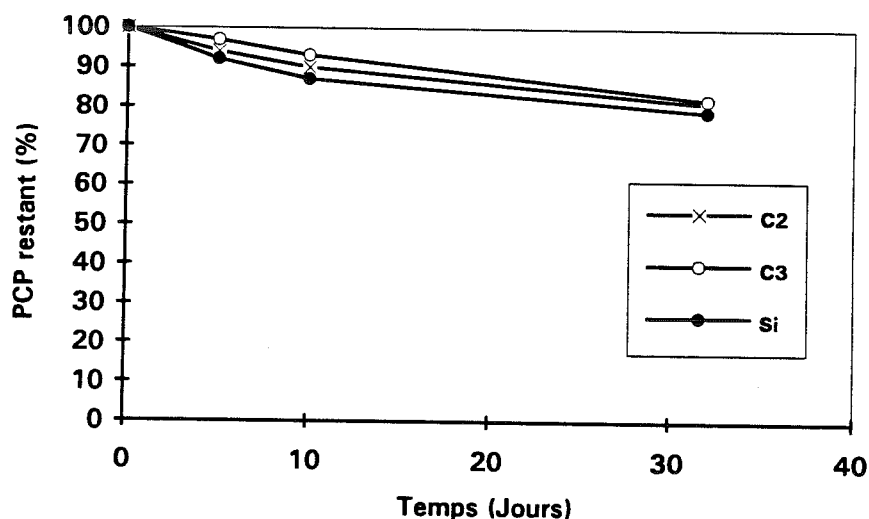


Figure IV-9 : Cinétique de dégradation du PCP par les bactéries isolées après conservation par le froid

Les résultats montrent que les souches ne semblent plus capables de dégrader le PCP en milieu liquide puisqu'on a moins de 20 % de disparition de PCP (dégradation ou adsorption sur la biomasse) et plus du tout de libération de chlorures dans le milieu de culture.

Des tests en milieux solides avec indicateur coloré montrent également qu'il n'y a plus acidification des milieux donc production d'ions chlorures, signe de la dégradation du PCP. Après avoir renouvelé les tests

de dégradation en milieu liquide en vérifiant la composition du milieu, le pH ou encore la température, nous avons dû nous rendre à l'évidence que les souches sélectionnées avaient perdu leurs capacités de dégradation vis à vis du PCP au cours de leur conservation ou de leur réactivation en milieu riche.

En l'absence de souches indigènes actives et conservables, nous avons choisi de tester un microorganisme connu pour ses aptitudes à utiliser le PCP.

Ce microorganisme devait satisfaire à certaines conditions directement liées aux contraintes expérimentales. En particulier, il fallait que ce soit une bactérie plutôt qu'un champignon, d'abord pour un problème de vitesse de croissance, la durée de l'étude étant limitée, mais aussi pour des commodités de manipulation, surtout en ce qui concerne la réintroduction en colonnes et le suivi de la migration des cellules au cours des écoulements.

Toujours pour un problème de durée, mais aussi de sensibilité des analyses chimiques, la bactérie choisie devait avoir des capacités de dégradation relativement élevées afin de pouvoir mettre en évidence la biodégradation, même pour des temps de contact courts et des concentrations faibles.

Enfin, les bactéries introduites dans les sols ne présentant pas toutes les mêmes aptitudes de survie, liées à leur capacité à coloniser les niches favorables à leur développement et à utiliser les substrats disponibles (Steinberg 1987, Richaume 1992), la bactérie de référence devait être, si possible, issue d'un sol plutôt que d'un autre écosystème.

Toutes ces contraintes nous ont conduit à choisir comme modèle bactérien un Actinomycète : *Rhodococcus chlorophenolicus* isolé par Apajalahti (1986) et connu pour ses capacités de dégradation de nombreux chlorophénols dont le PCP. Ce microorganisme semble avoir des capacités de survie et de dégradation supérieures aux bactéries à gram négatif et en particulier au *Flavobacterium* isolé par Saber & Crawford (1985).

En choisissant ce microorganisme comme modèle bactérien, nous ne prétendons pas avoir choisi le meilleur représentant de la fonction de dégradation des chlorophénols et en particulier de la déchloration, mais seulement un microorganisme présentant des potentialités compatibles

avec les contraintes de l'étude. Le choix d'un bon modèle bactérien est relativement difficile dans la mesure où les activités ou même les niveaux de populations peuvent varier assez rapidement en fonction des conditions environnementales ou des activités humaines (labours, pollutions, inondations), (Salkinoja Salonen et al. 1989).

On peut cependant dire, au vu de la présence assez générale du genre *Rhodococcus* dans tous les types de sols, que ce genre bactérien doit jouer un rôle important dans la transformation des composés aromatiques chlorés dans l'environnement, d'autant plus que d'après Hagglom et al. (1989), de nombreuses souches couvrant au moins 8 espèces sont capables d'attaquer des mono, di et trichlorophénols par hydroxylation ou O-méthylation. On sait par ailleurs que la capacité de dégradation des composés aromatiques naturels tels les phénols ou catéchols est très largement répandue dans le genre *Rhodococcus* (Rast et al. 1980).

IV-1-2 Les principales caractéristiques de *Rhodococcus chlorophenolicus*

IV-1-2-1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques

Rhodococcus chlorophenolicus est un Actinomycète qui a été isolé à partir de sédiments d'un lac contaminé par des chlorophénols (Apajalahti & Salkinoja-Salonen 1986). C'est une souche de référence disponible dans la banque de microorganismes allemande : la DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) sous la référence RF 43826. Le milieu de culture préconisé pour la croissance de ce microorganisme par la DSM est le milieu M65 dont la composition est la suivante :

CaCO ₃	2g	Extrait de malt	10g
Glucose	4g	Extrait de levure	4g
Agar	12g		
q.s.p	1l		

Des tests biochimiques d'identification (API) ont permis de caractériser les capacités métaboliques de *R. Chlorophenolicus* vis à vis de nombreux sucres utilisés comme source de carbone et d'énergie (Apajalahti & Salkinoja-Salonen 1986, annexe 9).

Cette souche est à gram positif, cytochrome-oxydase négative, catalase positive, aérobie stricte et apparaît en microscopie photonique sous forme de bâtonnets de 1 à 1,5 μm de large et 3 à 4 μm de long ; les cellules deviennent plus arrondies et coccoïdes après incubation et culture prolongées.

Cette souche présente un cycle morphologique avec alternance d'une forme plutôt coccoïdale ou en bâtonnet avec une forme pseudo mycélienne (Annexe 10).

Au cours de cette étude, certaines caractéristiques supplémentaires ont pu être obtenues et en particulier la relation densité cellulaire-densité optique a pu être établie.

Ceci a permis par la suite de suivre la densité de population des suspensions bactériennes en milieu liquide limpide simplement par la mesure de la turbidité à 600 nm :

$$N = 6,55.10^8 [\text{DO}]$$

ou N représente le nombre de cellules.ml⁻¹ et [DO] la densité optique à 600nm. C'est ainsi qu'une cinétique de croissance de cette souche en milieu liquide riche (Milieu LB) a pu être obtenue (figure IV-10).

On retrouve sur cette courbe les phases de latence, de croissance exponentielle et plateau. Un temps de génération a pu être estimé pour la phase de croissance exponentielle :

$$T_g = 2\text{h}15$$

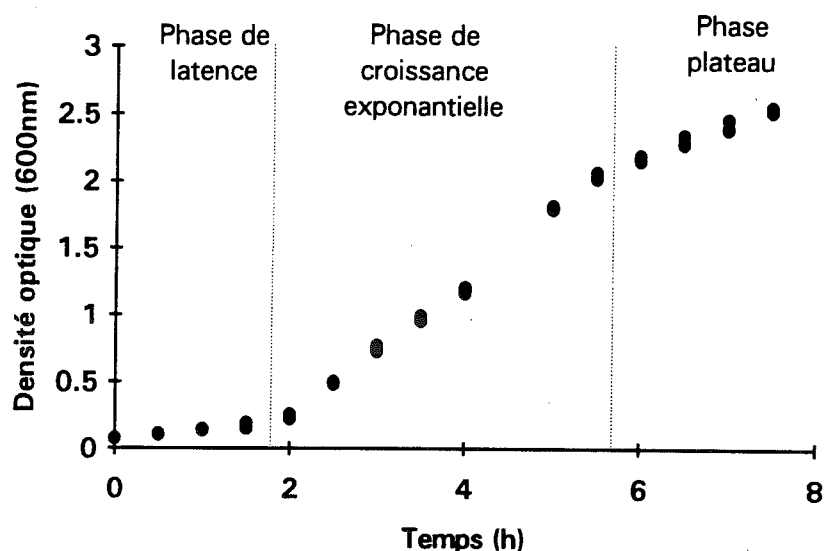


Figure IV-10 : Cinétique de croissance de *R. chlorophenolicus* sur le milieu LB (3 répétitions)

IV-1-2-2 Les capacités cataboliques de *Rhodococcus chlorophenolicus*

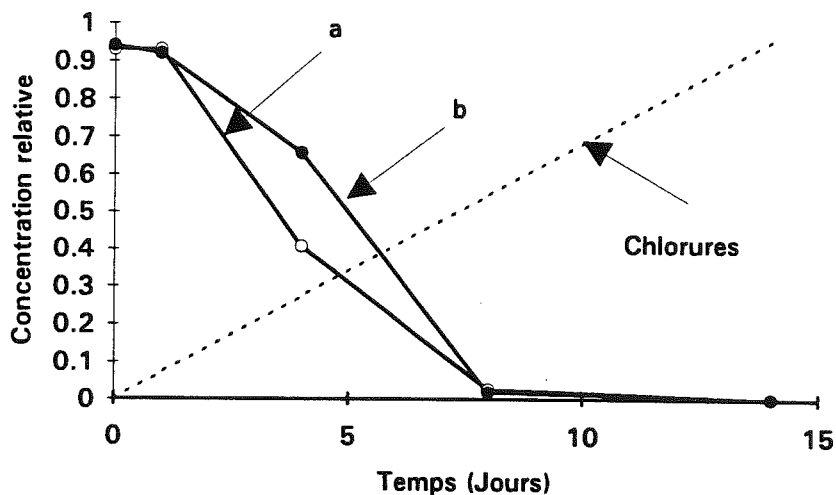
a/ Les conditions expérimentales

La caractérisation des capacités cataboliques de la souche de *Rhodococcus chlorophenolicus* a été effectué selon le même protocole expérimental en milieu liquide que pour les souches sélectionnées.

Comme précédemment, nous avons suivi la disparition du PCP en effectuant des dosages par CLHP sur des aliquotes prélevées dans la solution. Ces aliquotes ont servi également pour le dosage des ions chlorures (par CLHP en détection ionique) et pour le suivi du nombre de cellules présentes (mesure de la turbidité à 600 nm).

b/ Résultats

Une cinétique de dégradation du PCP à 10 mg.l⁻¹ avec deux inoculums de tailles différentes est présentée figure IV-11 :



a/ concentration en PCP avec un niveau d'inoculation de $3,4 \cdot 10^8$ cellules.ml⁻¹

b/ concentration en PCP avec un niveau d'inoculation de $1,7 \cdot 10^8$ cellules.ml⁻¹

Figure IV-11 : Cinétique de dégradation du PCP par *R. chlorophenolicus* à 2 niveaux d'inoculation différents

On peut voir que lors de la mise en contact du PCP avec les cellules bactériennes, 7 à 8% du PCP sont très rapidement adsorbés sur la biomasse, ce qui avait déjà été observé avec les souches sélectionnées précédemment (10 à 15% d'adsorption).

Le calcul de la pente de ces cinétiques de dégradation pour les deux inoculums a permis d'estimer les vitesses initiales de dégradation (V_i) à 10mg.l⁻¹ :

$$V_{i1} = 236 \mu\text{g dégradés en 72 h par } 1,3 \cdot 10^{10} \text{ cellules} \\ \text{soit } 10^{-18} \text{ mole.h}^{-1} \text{ cellule}^{-1}$$

$$V_{i2} = 116 \mu\text{g dégradés en 72 h par } 6,7 \cdot 10^9 \text{ cellules} \\ \text{soit } 0,9 \cdot 10^{-18} \text{ mole.h}^{-1} \text{ cellule}^{-1}$$

On obtient ainsi une valeur moyenne de la vitesse initiale de dégradation de $0,95 \cdot 10^{-18}$ mole. cellule⁻¹.h⁻¹.

Nous avons également suivi le nombre de cellules présentes au cours de la cinétique de dégradation, ce qui a permis de constater que celui ci est relativement stable au cours du temps, la concentration en PCP étant trop

faible pour provoquer une croissance cellulaire détectable par rapport à l'inoculum.

Une autre cinétique de dégradation du PCP a été obtenue dans les mêmes conditions mais avec une concentration de 50 mg.l^{-1} . Nous avons pu calculer de la même manière une vitesse initiale de dégradation du PCP :

$$\begin{aligned} V_i &= 2120 \text{ } \mu\text{g dégrados en 20 jours par } 10^{10} \text{ cellules} \\ &\text{soit } 1,55 \cdot 10^{-18} \text{ mole.h}^{-1} \text{ cellule}^{-1} \end{aligned}$$

Comme précédemment, le nombre de cellules en solution est resté relativement stable : il a diminué seulement d'un facteur 1,2 sur un mois. De même, on a observé que 9,6% du PCP introduit était adsorbé sur la biomasse cellulaire.

L'utilisation de ces deux valeurs de vitesses initiales de dégradation a permis d'estimer très grossièrement les paramètres μ_{\max} et K_S (chapitre III) intrinsèques à la souche de *Rhodococcus* dans les conditions expérimentales suivies (milieu minéral minimum et PCP comme seule source de carbone à 28°C et pH 7) (figure IV-12) :

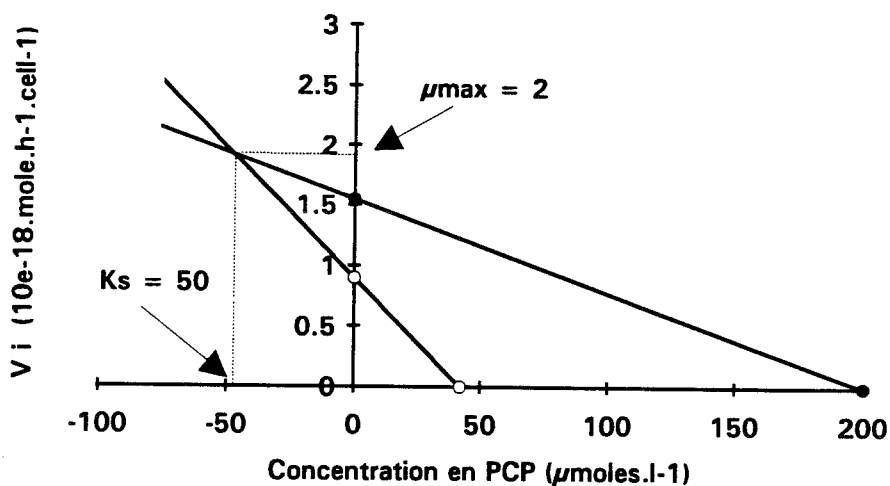


Figure IV-12 : Estimation des paramètres μ_{\max} et K_S selon la représentation linéaire directe d'Eisenthal et Cornish Bawden

Les valeurs obtenues sont :

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= 2 \cdot 10^{-18} \text{ mol.h}^{-1} \cdot \text{cellule}^{-1} \\ K_S &= 50 \text{ } \mu\text{M} \end{aligned}$$

Ces valeurs, bien que peu précises en raison du faible nombre de concentrations en PCP testées, pourront être utilisées comme valeurs maximales observées dans le sol en conditions naturelles pour la suite de l'étude.

IV-1-2-3 Caractérisation plasmidique de *R. chlorophenolicus*

La littérature ayant montré que les gènes responsables de la dégradation de nombreuses molécules organiques aromatiques sont portées par des plasmides (Karns 1989, Kawasaki & Tonomura 1981, Chatterjee et al. 1982, Chakrabarty 1986) nous avons entrepris de caractériser les plasmides de *R. chlorophenolicus*.

La technique utilisée est la technique d'Eckardt décrite au paragraphe IV A/ 2-1-2.

Cette technique ne permettant pas de récupérer les plasmides observées, nous avons utilisé pour cela la technique de lyse alcaline décrite dans l'annexe 11.

Afin de mettre en évidence un éventuel effet inducteur du PCP, nous avons analysé la souche de *R. chlorophenolicus* cultivée sur milieu riche ou sur le milieu MSX50.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV-13.

On observe sur cette figure que la souche de *R. chlorophenolicus* cultivée sur milieu riche présente au moins 7 plasmides de taille inférieure à 120 MDa, dont 2 très petits qu'on retrouve dans la souche cultivée avec du PCP (ils ne sont pas très visibles sur cette photo, mais leur présence a été vérifiée par ailleurs).

L'utilisation de la souche d'*Agrobacterium* pour l'étalonnage de la taille des plasmides n'a pas permis d'estimer avec précision la taille des plasmides de *R. chlorophenolicus*.

Une simple estimation a pu être obtenue pour les plasmides de plus grande taille :

R. chlorophenolicus cultivé en milieu riche :

- 2 plasmides d'environ : 100 ; 80 MDa

R. chlorophenolicus cultivé en présence de PCP :

- 3 plasmides d'environ : 100 ; 80 ; 45 MDa

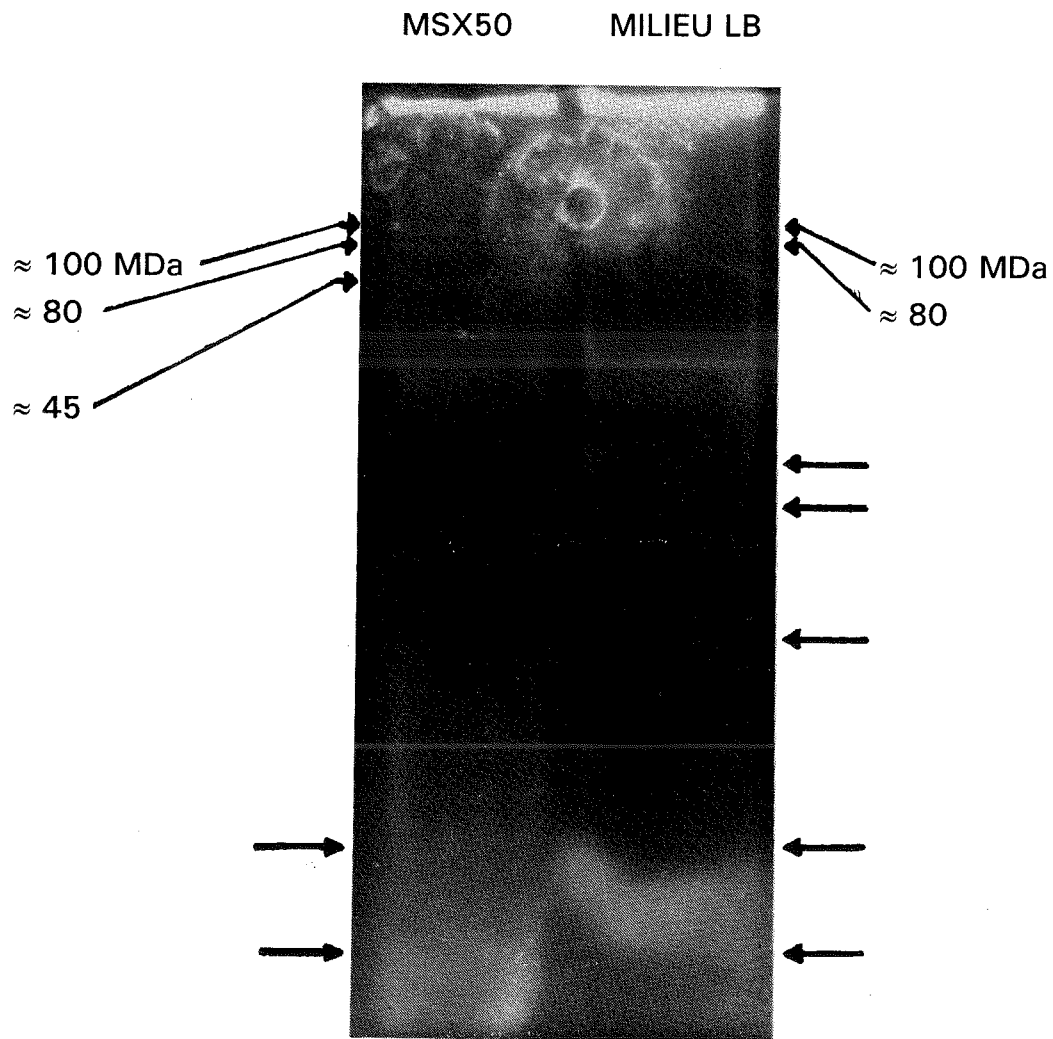


Figure IV-13 : Profil plasmidique de *R. chlorophenolicus*

On voit donc que la culture de *R. chlorophenolicus* sur milieu minimum avec du PCP entraîne la disparition de 3 plasmides de taille intermédiaire et l'apparition d'un nouveau plasmide d'environ 45 MDa.

IV-1-3 Discussion

Un des objectifs de ce travail était d'utiliser une des bactéries isolées dans la première partie (si possible la plus performante) pour la caractérisation et l'estimation des paramètres susceptibles d'être utilisés dans la modélisation mathématique. La perte d'activité constatée après la

congélation des souches isolées nous a contraint d'utiliser une souche bactérienne de référence connue pour ses capacités de dégradation du PCP.

La perte d'activité des bactéries, malgré les inconvénients causés au cours de cette étude, a eu l'avantage de nous confronter aux problèmes de conservation des bactéries et de leurs capacités spécifiques. Ce phénomène, souvent rencontré avec les microorganismes résistants aux métaux lourds (Rayner & Sadler 1989), semble être dû, généralement, à l'instabilité des plasmides portant les caractères spécifiques des fonctions perdues.

Il a été le plus souvent décrit lorsque des microorganismes étaient confrontés à de fortes concentrations en xénobiotiques qui constituaient alors une pression de sélection obligeant ainsi le microorganisme à conserver les caractères génétiques (plasmides) lui apportant la résistance à cette toxicité (Fournier 1989). La disparition de la pression de sélection entraîne alors la disparition de ce caractère génétique et donc de la dégradation spécifique.

Dans notre cas, les concentrations utilisées sont relativement faibles. On peut donc supposer que l'on n'a pas affaire à ce type d'événement. De plus, les souches isolées ne présentent pas de plasmide excepté la souche Si, et la conservation de son plasmide après la perte de capacité a par ailleurs été vérifiée.

Une explication possible pour ce phénomène est que les souches ont subi au cours de la phase d'enrichissement, une microévolution (mutation, changement de spécificité enzymatique...) qui aurait régressée lors de la conservation par le froid entraînant la perte des capacités acquises.

On peut également supposer que ces capacités sont conférées par un plasmide qui n'a pas été mis en évidence par la technique utilisée (trop gros ou trop petit) et qui n'a pas été conservé.

Il est cependant assez difficile de trancher quant à l'explication la plus probable. On peut dire néanmoins que ce phénomène a été rencontré par ailleurs (Truffaud com. perso.) ce qui nous a conduit à préférer la conservation sur milieu solide qui semble apparemment éliminer ou réduire les problèmes d'instabilité plasmidique.

En ce qui concerne la caractérisation des capacités cataboliques de *R. chlorophenolicus*, nous avons pu obtenir des taux de dégradation correspondant à deux concentrations initiales différentes. Bien

qu'insuffisantes pour obtenir une précision satisfaisante, les deux valeurs obtenues nous ont permis de calculer les paramètres μ_{\max} et K_S intrinsèques à la bactérie étudiée pour les conditions données.

Il faut toutefois rappeler que ces paramètres sont déterminés à l'équilibre et ne prennent pas en compte les phénomènes cinétiques qui vont déterminer les concentrations auxquelles les bactéries seront réellement confrontées dans les sols.

Les valeurs de v_i comprises entre $0,95 \cdot 10^{-18}$ et $1,5 \cdot 10^{-18}$ mole.h⁻¹ cellule⁻¹ sont du même ordre de grandeur que celle obtenu par Apajalahti & Salkinoja-Salonen (1987) pour une concentration initiale de $10 \mu\text{M}$: $4,4 \cdot 10^{-18}$ mole.h⁻¹ cellule⁻¹ et malgré des conditions de culture différentes.

Cet auteur a effectué également une étude concernant l'effet de la température sur la vitesse de dégradation du PCP (figure IV-14). Il semble que la vitesse de dégradation diminue avec la température d'environ un facteur 3 tous les 10°C, montrant ainsi que l'effet de la température peut être représenté dans la modélisation par un paramètre Q_{10} classiquement utilisé en biochimie et correspondant à la baisse d'activité observée avec une baisse de température de 10°C.

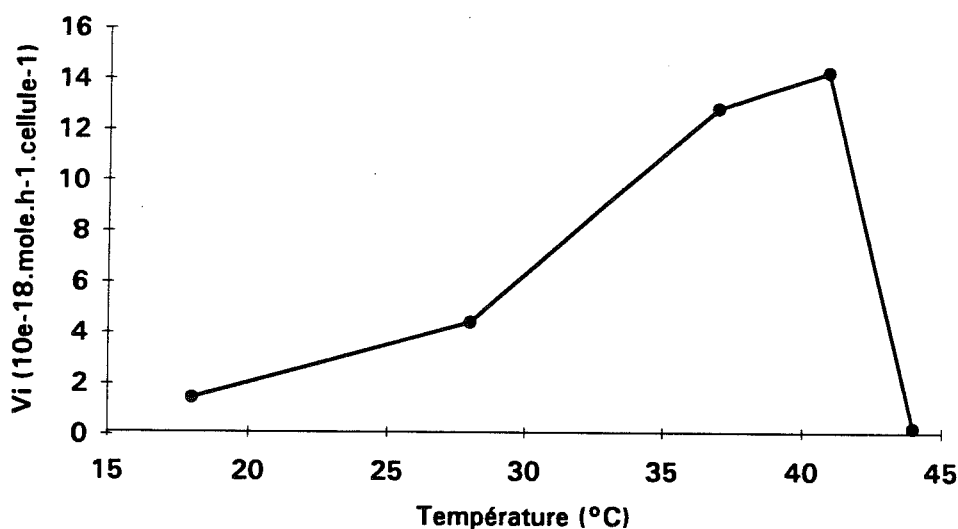


Figure IV-14 : Effet de la température sur la vitesse de dégradation du PCP par *R. chlorophenolicus* (adapté de Apajalahti 1987)

En ce qui concerne la caractérisation plasmidique de *R. chlorophenolicus*, nous avons pu constater que cette souche présente un stock plasmidique qui semble varier avec le milieu de culture utilisé. On a ainsi pu observer la présence de 7 plasmides lorsque les cellules étaient

cultivées en milieu organique riche et dont les tailles varient d'environ 85 MDa (environ $130 \cdot 10^3$ paires de bases) à environ 10^4 Da (0,5 Kbp).

Il semble donc que les trois plasmides qui ont disparus servaient à la cellule pour la dégradation des macromolécules du milieu riche. En milieu minimum, la synthèse de ces plasmides est une charge pour les cellules ce qui a entraîné leur disparition. L'apparition du nouveau plasmide doit donc être en relation avec la nature du milieu de culture : milieu minéral avec du PCP.

Il n'est donc pas impossible que ce plasmide soit utilisé par cette souche pour la dégradation du PCP, bien qu'aucun plasmide catabolique n'ait jamais été décrit comme responsable de sa dégradation.

Ceci reste donc à confirmer par d'autres études passant par l'extraction et l'isolement de ce plasmide.

On peut toutefois noter que ce plasmide (45 MDa) possède une taille assez proche de celui observé dans la souche de *Pseudomonas* (S₁) isolée du sol brun lessivé sous prairie.

IV-2 Survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de sol stérile

Après avoir caractérisé les capacités de dégradation de cette souche, il était indispensable pour la suite de l'étude, de connaître ses capacités de survie dans le sol étudié et éventuellement son activité en milieu naturel.

Pour cela, des études en microcosmes avec de petites quantités de sol ont été entreprises.

Les microcosmes sont très largement utilisés en microbiologie du sol car ils permettent de simplifier l'environnement complexe que représente le sol (stérilisation, conditions abiotiques contrôlées...).

Ces systèmes conduisent à l'acquisition de données de base permettant d'établir les mécanismes de certains processus microbiologiques comme la prédation, la compétition (Steinberg 1987, Ramirez & Alexander 1980) ou les transferts génétiques (Richaume 1992, Recorbet 1993).

Les microcosmes sont généralement constitués de récipients contenant de faibles quantités de sol, et permettant de mener des études en conditions standardisées et reproductibles avec de nombreux échantillons.

IV-2-1 Les conditions expérimentales

IV-2-1-1 Les microcosmes

Pour cette étude, nous avons utilisé deux types de microcosmes constitués soit de petits flacons en verre à fond plat de 20 ml pour le premier type de microcosmes (5 g de sol) et de pots en verre de 100 ml pour le deuxième type (30 g de sol)

Le sol utilisé pour ces études est le sol brun lessivé sous culture, utilisé dans les études sur le transfert du PCP dans le sol.

Le sol a été introduit humide dans les microcosmes et à raison de 5 g correspondant à 4,2 g de sol sec pour les petits microcosmes et de 38 g correspondant à 31,7 g de sol sec pour les gros microcosmes.

La densité sèche apparente du sol a été ajustée à la valeur obtenue en colonnes de sol qui correspond approximativement à la densité observée in situ (Thony comm. perso.)

La densité a été ajustée après avoir mesuré sur les microcosmes le volume correspondant à la masse utilisée et après avoir introduit les bactéries.

Nous avons ainsi préparé environ 200 microcosmes de 5g et 50 microcosmes de 30g divisés en 5 séries correspondant aux différents traitements de teneur en eau, d'inoculum et de concentration en PCP testés.

IV-2-1-2 Inoculation des microcosmes, extraction et dénombrement des bactéries

La souche de *R. chlorophenolicus* a été cultivée en milieu riche LB à 28°C jusqu'à la phase plateau. Les cellules ont alors été lavées deux fois avec de l'eau déminéralisée après centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes.

Après le dernier lavage, les cellules ont été reprises dans un volume d'eau adéquat pour obtenir la densité de population souhaitée. Celle ci est mesurée par turbidimétrie à 600 nm.

Les densités bactériennes ont été ajustées en fonction des volumes ajoutés qui ont eux mêmes été ajustés afin d'obtenir des teneurs en eau proches de celles utilisées dans le cadre des études de transfert en colonnes (chapitre V) : environ 30 et 50% de teneur en eau volumique.

Au jour $J = 0$, l'inoculation des microcosmes a été effectuée de la manière la plus homogène possible par addition goutte à goutte de la suspension, suivie du mélange de l'ensemble eau + sol + bactéries et tassement du sol jusqu'à obtention de la densité sèche désirée.

Les essais effectués en présence de PCP ont été effectués par addition de PCP dans les microcosmes selon deux protocoles différents : soit en même temps que les bactéries à $J = 0$, en remplaçant l'eau déminéralisée par une solution de PCP à la concentration désirée, soit, après stabilisation de la population bactérienne dans le sol en ajoutant de faibles volumes de solutions de PCP permettant d'obtenir les concentrations finales souhaitées.

Il faut noter que dans le deuxième cas, la teneur en eau du microcosme est modifiée au cours de la cinétique de survie, et il faut en tenir compte lors du calcul du volume d'extraction des microorganismes.

Les microcosmes sont incubés en chambre chaude non éclairée à 28°C. L'extraction des microorganismes a été effectuée suivant le protocole décrit au paragraphe IV A/ 2-2-1-b par broyage du sol au mixer avec 100 ml d'une solution de NaCl à 0,85%.

Dans le cas des microcosmes de 5 g deux échantillons de chaque série ont été sacrifiés, chaque fois, plus un troisième pour la mesure de la teneur en eau. Pour les microcosmes de 30 g, un seul échantillon de chaque série est sacrifié à la fois, une partie du sol est utilisée pour la mesure de la teneur en eau (par séchage à 105°C, 24 heures), le reste étant utilisé pour les dénombrements.

Les suspensions ainsi obtenues sont alors diluées au $1/10^6$ en série. Un volume de suspension de 0,2 ml correspondant aux niveaux de dilution appropriés a été étalé sur le milieu de dénombrement qui est ici le milieu LB. Ce milieu a été préféré au milieu M65 malgré une meilleure croissance sur ce dernier, car c'est un milieu opaque rendant le dénombrement des colonies bactériennes sur les boîtes de Petri, difficiles.

IV-2-2 Résultats

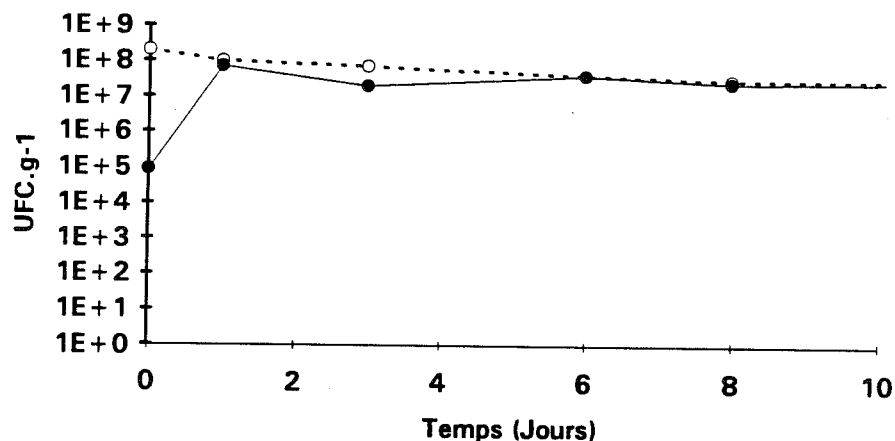
IV-2-2-1 Survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de 5 g

a/ Effet de la taille de l'inoculum

Les résultats concernant l'effet de l'inoculum sur la survie de *R. chlorophenolicus* sont présentés dans la figure IV-15

On observe en particulier que pour des inoculums très différents (10^8 et 10^5 bactéries.g⁻¹ de sol sec) le niveau de population se stabilise dans les deux cas à une valeur d'environ $5 \cdot 10^7$ cellules.g⁻¹ de sol sec correspondant à la capacité biotique de ce sol.

De plus, il semble que cet équilibre soit atteint assez rapidement et en tous cas en moins de 5 jours. Le niveau de population semble relativement stable au cours du temps, au moins jusqu'à 22 jours.



UFC = unité cellulaire formant une colonie

Figure IV-15 : Effet de la taille de l'inoculum sur le niveau de population de *R. chlorophenolicus* en sol stérile

b/ Effet de la teneur en eau

Les variations de teneur en eau au cours de cette expérimentation sont présentées dans la figure IV-16 :

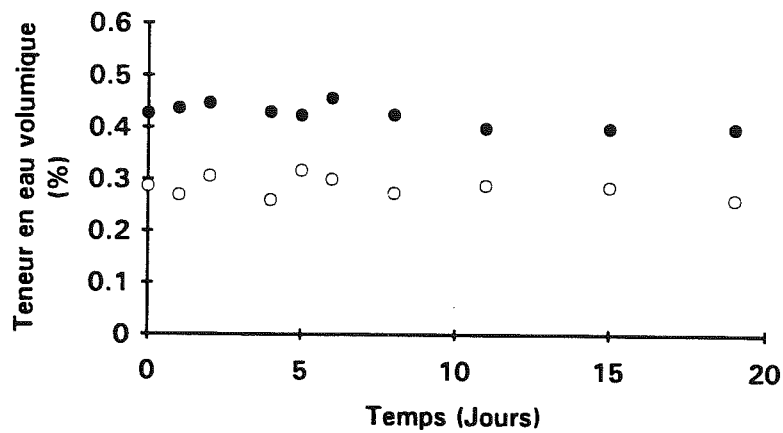


Figure IV-16 : Suivi de deux teneurs en eau des microcosmes au cours de l'étude de la survie de *R. chlorophenolicus* en sol stérile

Au vu de ces résultats, on peut dire que la teneur en eau est restée stable tout au long de l'expérience quelle que soit la teneur en eau initiale.

Les résultats concernant l'effet de la teneur en eau sur la survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de sol stérile sont présentés dans la figure IV-17 :

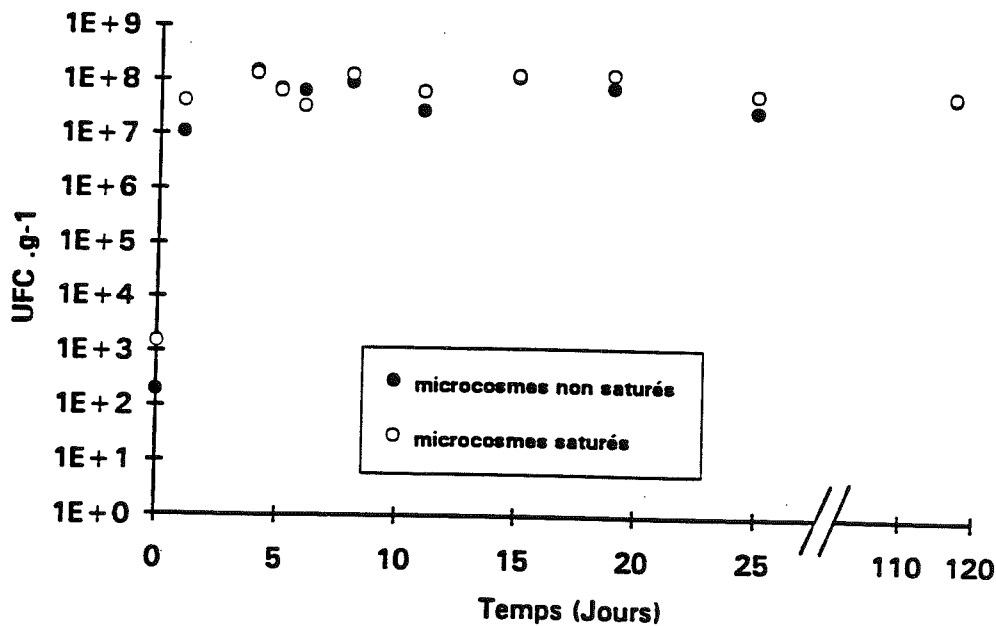


Figure IV-17 : Effet de la teneur en eau sur la survie de *R. chlorophenolicus* en sol stérile

Il apparait que le niveau de population n'est pas significativement différent pour les 2 teneurs en eau testées, puisque dans les deux cas, il se

stabilise à une valeur moyenne de $4 \cdot 10^7$ cellules.g⁻¹ de sol sec, proche de celle observée précédemment.

Il semble donc que pour des valeurs de teneur en eau relativement différentes (bien que représentant de l'eau gravitaire dans les deux cas), la survie de *R. chlorophenolicus* n'est pas affectée.

c/ Effet du pentachlorophénol

Les résultats concernant l'effet du PCP sur la survie de *R. chlorophenolicus* sont présentés dans la figure IV-18.

Les concentrations en PCP introduites à J = 0 sont de 10 et 100 mg.l⁻¹ dans l'eau du sol correspondant à 2,6 et 26 µg.g⁻¹ de sol sec.

On peut observer sur la figure IV-18 qu'une concentration en PCP de 10 mg.l⁻¹ dans la phase liquide ne semble pas avoir d'effet significatif sur la survie de *R. chlorophenolicus* sur la période testée. En revanche, lorsque la concentration en PCP atteint 100 mg.l⁻¹, on observe une stagnation du nombre de cellules approximativement à la valeur de l'inoculum, pendant une dizaine de jours, après quoi la population augmente progressivement jusqu'au niveau obtenu sans PCP.

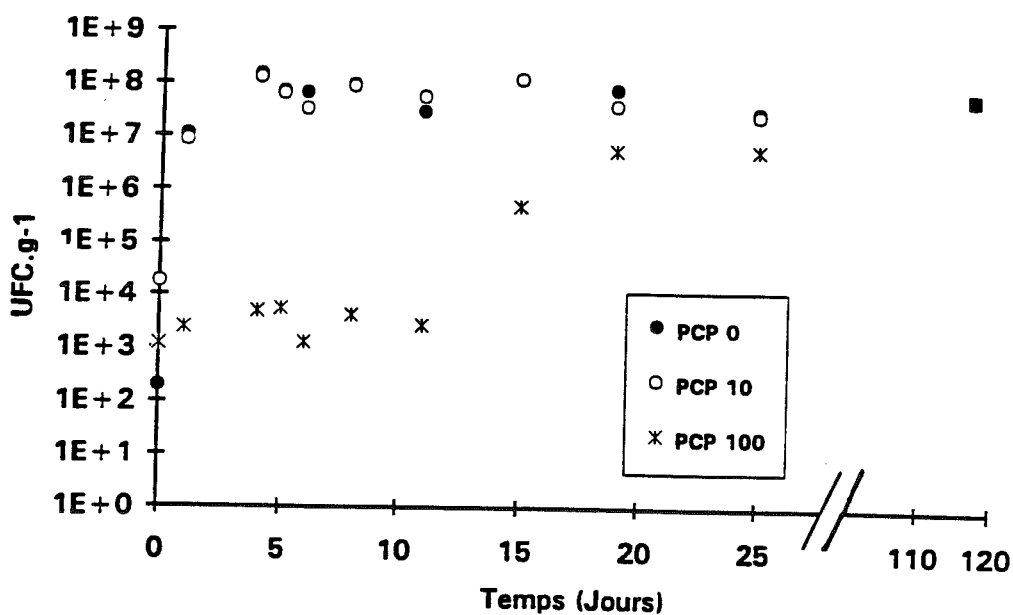


Figure IV-18 : Effet de la concentration sur la survie de *R. chlorophenolicus* en sol stérile

Nous avons également testé l'effet de la concentration en PCP sur une population déjà établie dans le sol. Les résultats sont présentés dans la figure IV-19 :

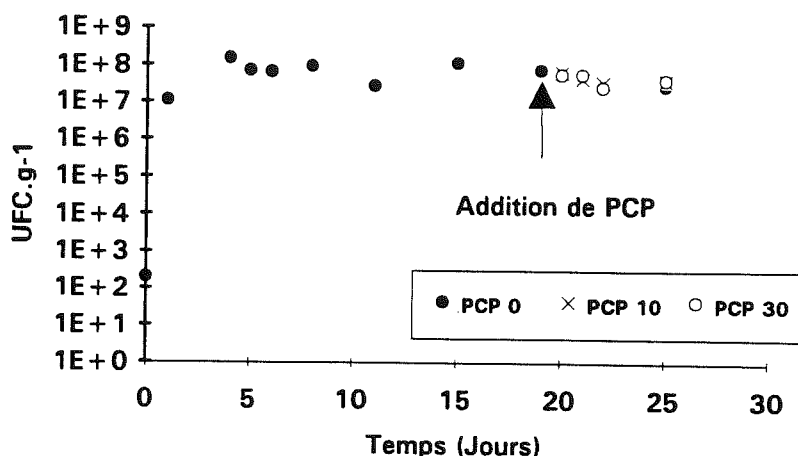


Figure IV-19 : Effet du PCP sur une population de *R. chlorophenolicus* préétablie en sol stérile

Les concentrations introduites sont de 10 et 30 mg.l⁻¹ dans l'eau du sol correspondant à 3,5 et 10,5 µg.g⁻¹ de sol sec.

Aucune des deux concentrations ne semble avoir d'effet dépressif sur le niveau d'une population de *R. chlorophenolicus* déjà établie depuis trois semaines. Il faut cependant souligner que la concentration la plus élevée (30 mg.l⁻¹) est nettement inférieure à celle utilisée précédemment (100 mg.l⁻¹).

IV-2-2-2 Survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de 30g de sol

a/ Effet de la teneur en eau

Les essais en microcosmes de 30 g ont été effectués de la même manière que ceux de 5 g et en particulier avec les mêmes méthodes d'extraction et de dénombrement.

Le choix des microcosmes de 30 g a été fait pour mettre en évidence un éventuel effet du flacon (effets de bord, taille et de la quantité de sol employée).

Les résultats concernant l'effet de la teneur en eau sur la survie de la population introduite sont présentés figure IV-20 :

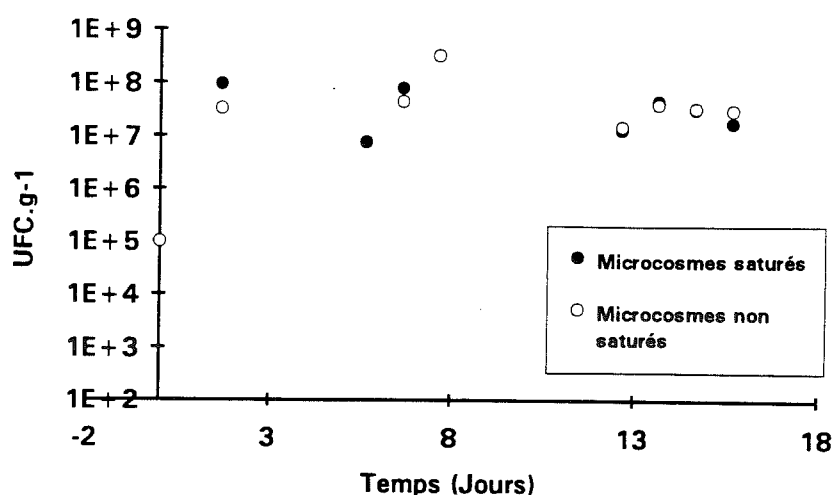


Figure IV-20 : Effet de la teneur en eau sur la survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de 30 g de sol stérile

Comme pour les microcosmes de 5 g, il ne semble pas y avoir d'effet significatif de la teneur en eau sur la survie de *R. chlorophenolicus*, au moins pour cette gamme de teneur en eau. On remarque cependant que les points sont beaucoup plus dispersés que précédemment. Le niveau d'équilibre de la population se situe approximativement à 5×10^7 cellules.g⁻¹ valeur qui n'est pas significativement différente de celle obtenue avec les microcosmes de 5 g compte tenu de la dispersion des points.

b/ Effet de la concentration en PCP

Les résultats sont présentés dans la figure IV-21 :

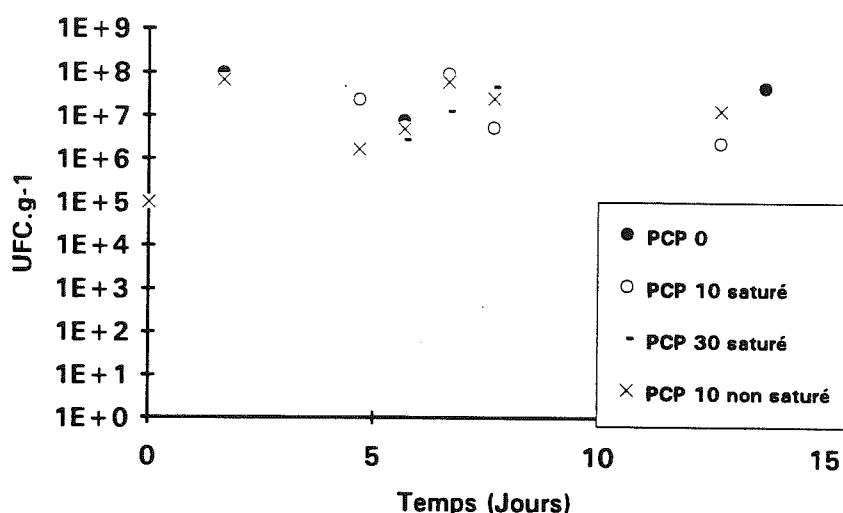


Figure IV-21 : Effet du PCP sur la survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de 30 g de sol stérile

Les concentrations en PCP ajoutées sont de 10 et 30 mg.l⁻¹ pour les microcosmes à forte teneur en eau (50% volumique) correspondant à 2,2 et 11 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol sec respectivement. Pour les microcosmes à faible teneur en eau, une seule concentration en PCP a été testée c'est celle de 10 mg.l⁻¹ qui correspond à 0,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol sec.

Dans tous les cas de figures, il semble que le PCP, à ces concentrations, n'influe pas sur le niveau de population de *R. chlorophenolicus*. Cependant, tout comme pour les paramètres hydriques, il faut noter une forte dispersion des points allant jusqu'à une puissance de dix.

Comme précédemment, le niveau d'équilibre de la population se situe entre 10⁷ et 10⁸ cellules.g⁻¹ de sol sec.

L'effet du PCP sur une population de *R. chlorophenolicus* stabilisée dans le sol depuis environ deux semaines (figure IV-22) a également été testé. La concentration en PCP dans l'eau du sol était de 10 mg.l⁻¹ correspondant à 4,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol sec pour les microcosmes saturés en eau et 3,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sol sec pour les microcosmes non saturés en eau.

Comme pour les microcosmes de 5 g, il ne semble pas y avoir d'effet positif ou négatif significatif sur le niveau de population préétabli.

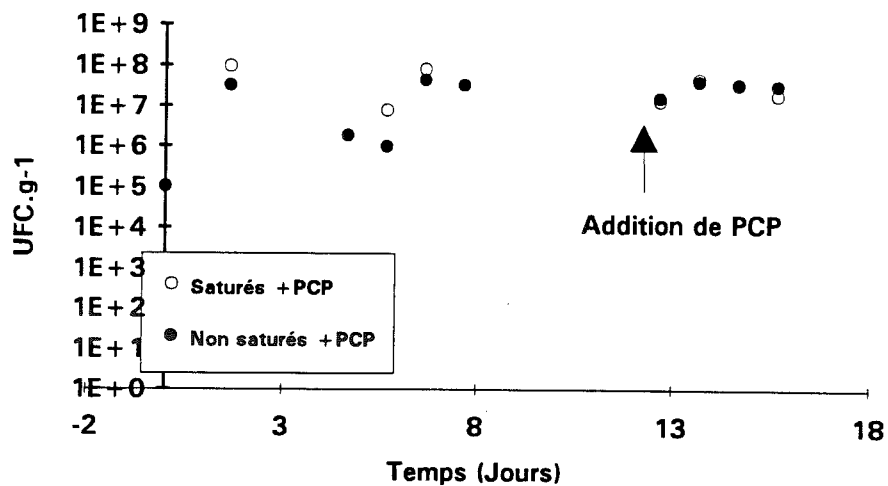


Figure IV-22 : Effet du PCP sur une population de *R. chlorophenolicus* préétablie en microcosmes de 30 g de sol stérile

IV-2-3 Discussion

Les résultats concernant l'effet de l'inoculum ont permis de montrer que le niveau d'équilibre de la population de *R. chlorophenolicus* dans le sol sont indépendants de la taille de l'inoculum de départ, et qu'il ne dépend apparemment que du sol lui-même (substrats disponibles) et de la souche bactérienne étudiée (besoins en nutriment). Ce résultat est en accord avec les observations de Steinberg (1987) avec une souche de *Bradyrhizobium japonicum* dans un sol brun lessivé et par Richaume (1992) avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats obtenus avec les deux types de microcosmes sont approximativement identiques dans chaque type d'étude menée. On a néanmoins pu noter une imprécision plus grande avec les microcosmes de 30 g, due au fait que l'on a pas utilisé la totalité du sol pour les dénombrements (seulement 1/3), ce qui montre la difficulté d'obtenir une inoculation homogène dès qu'on augmente la quantité du sol. L'absence de répétitions vraies (plusieurs échantillons) avec les microcosmes de 30 g est également à l'origine de la variabilité observée dans les dénombrements.

Le fait d'obtenir des résultats similaires avec les microcosmes de 5 et 30 g permet d'affirmer que ces résultats sont assez peu entachés des conditions expérimentales (interférences avec les récipients, contacts

favorisés...) et qu'ils peuvent être utilisés tels quels pour la caractérisation des différents mécanismes étudiés.

L'étude sur l'établissement de *R. chlorophenolicus* en sol stérile à deux teneurs en eau a permis de montrer que dans ces conditions expérimentales, la saturation en eau du sol ne semble pas affecter la survie de ce microorganisme.

Ceci est assez étonnant dans la mesure où *R. chlorophenolicus* est aérobie stricte et que l'on sait que ce paramètre affecte normalement la survie des microorganismes (Stotzky 1974), en limitant la diffusion des gaz et en particulier l'oxygène. Un résultat similaire a cependant été obtenu avec une souche d'*Escherichia coli* dans un sol sableux (Richaume 1992).

De plus, on peut voir que le niveau de population reste stable sur une période de 4 mois, confirmant ainsi les résultats obtenus par Haggblom (1992) selon lesquels *R. chlorophenolicus* survit plus de 6 mois tout en gardant ses capacités de dégradation.

En ce qui concerne l'étude de l'effet du PCP sur la survie de *R. chlorophenolicus*, nous avons pu constater que lorsque ce microorganisme était préétabli dans le sol, les concentrations en PCP testées, allant jusqu'à 30 mg.l⁻¹ et correspondant à 11 µg.g⁻¹, étaient sans effet quelle que soit la teneur en eau testée.

En revanche, lorsque le PCP et les cellules sont introduits dans le sol simultanément, la concentration semble avoir un effet car on a pu observer qu'avec 100 mg.l⁻¹ de PCP (26 µg.g⁻¹) l'établissement et la croissance de *R. chlorophenolicus* étaient retardés pendant une dizaine de jours, alors qu'avec les concentrations plus faibles allant jusqu'à 30 mg.l⁻¹ (10 µg.g⁻¹), aucune différence avec le témoin n'était constatée.

Ce résultat est assez étonnant car certains auteurs ont montré que *R. chlorophenolicus* était non seulement insensible à de telles concentrations mais qu'en plus elle restait active et qu'elle continuait à dégrader le PCP mais aussi d'autres chlorophénols (Valo et al. 1990, Middeldorp 1990).

Si les résultats observés avec une concentration de 100 mg.l⁻¹ correspondent bien à une inhibition de la croissance cellulaire par le PCP, on peut attribuer la phase de latence observée à la cinétique de fixation du PCP par le sol au contact de laquelle se trouvent les cellules (compartiment externe). De plus, si le PCP est dégradé, une partie de la phase de latence peut correspondre à l'induction et à la synthèse des enzymes nécessaires à

sa dégradation. La détoxification serait alors effectuée par des processus biologiques et physico-chimiques. Il apparaît ainsi que l'évaluation de la dégradation du PCP par *R. chlorophenolicus*, non plus en milieu liquide, mais directement dans le sol, est indispensable.

Cependant, le suivi de la biodégradation est relativement délicat, car comme nous l'avons vu au paragraphe II-2-4-5, les produits de dégradation potentiels sont très fortement retenus dans le sol et surtout parce que la dégradation du PCP par ce microorganisme est complète et conduit à la libération de CO₂.

L'utilisation d'un marquage isotopique est donc indispensable pour pouvoir suivre la libération de CO₂.

Une expérimentation en microcosmes de 30 g avec du PCP marqué au carbone 13 a été menée au cours de ce travail, cependant, le trop faible $\Delta^{13}\text{C}$ utilisé ainsi que la conservation prolongée des échantillons a conduit à des résultats inexploitable. Le renouvellement de cette expérience est cependant envisagé.

Ce type d'étude a déjà été effectué avec la même bactérie et du PCP marqué au ¹⁴C (Middeldorp et al. 1990). Cette étude a permis de montrer que *R. chlorophenolicus* était capable de dégrader le PCP *in situ* à des taux non négligeables et du même ordre de grandeur que ceux obtenus en milieu liquide dans notre étude : 1,7 à 3,2. 10⁻¹⁸ mole.h⁻¹ cellule⁻¹ pour une concentration de 630 µg.g⁻¹ et 2,3. 10⁻¹⁹ à 1,7. 10⁻¹⁹ mole.h⁻¹ cellule⁻¹ pour une concentration de 30 µg.g⁻¹.

Ceci confirme que les paramètres obtenus en milieu liquide sont des valeurs maximales et que sans doute, les valeurs à utiliser dans le sol seront inférieures.

IV-3 Survie de *R. chlorophenolicus* en sol non stérile

L'étude de la survie de *R. chlorophenolicus* en sol non stérile a été abordée de la même manière qu'avec le sol stérile à la différence que les dénombrements des cellules n'ont pas pu être effectués de manière indirecte sur boîte de Petri compte tenu du fait que d'autres microorganismes étaient présents et qu'il fallait les différencier de la souche qui nous intéresse.

Comme pour les souches isolées à partir du sol enrichi, nous avons décidé d'effectuer un marquage immunologique de la souche étudiée. Pour cela, nous avons suivi le protocole décrit au paragraphe IV A/ 2-2-1a qui nous a permis d'obtenir une quantité de sérum de lapin suffisante pour toute la durée de l'étude.

Pour cette étude, l'utilisation de gros microcosmes n'était plus indispensable, nous nous sommes donc contenté d'utiliser les microcosmes de 5 g décrits précédemment.

Les conditions expérimentales sont exactement les mêmes qu'avec le sol stérile : modes d'inoculation, d'incubation et d'extraction identiques, les différences intervenant au niveau du dénombrement, pour lequel on utilise le protocole décrit au paragraphe IV A/ 2-2-1b en ce qui concerne la souche de *R. chlorophenolicus* et au paragraphe IV A/ 2-2-1c en ce qui concerne la microflore totale du sol.

Les résultats présentés représentent la moyenne des résultats obtenus sur trois échantillons.

Les résultats précédents ayant montré qu'il n'y avait pas d'effet significatif de la teneur en eau sur la survie de *R. chlorophenolicus*, nous avons donc mené cette étude à une seule teneur en eau à l'intérieur de la gamme étudiée précédemment : 40% volumique, correspondant à 30% en poids sec.

IV-3-1 Résultats

IV-3-1-1 Obtention d'un marquage spécifique de *R. chlorophenolicus*

Le titre du sérum de lapin a été obtenu par des essais sur lame microprint. Il s'est avéré qu'à une dilution au 1/1280^e, le marquage, excellent jusque là (forte fluorescence), commençait à faiblir (fluorescence moyenne), nous avons donc décidé d'utiliser pour la suite de l'étude, le sérum à une dilution au 1/640^e.

La figure IV-23 représente une photographie de cellules de *R. chlorophenolicus* après marquage par le sérum spécifique.

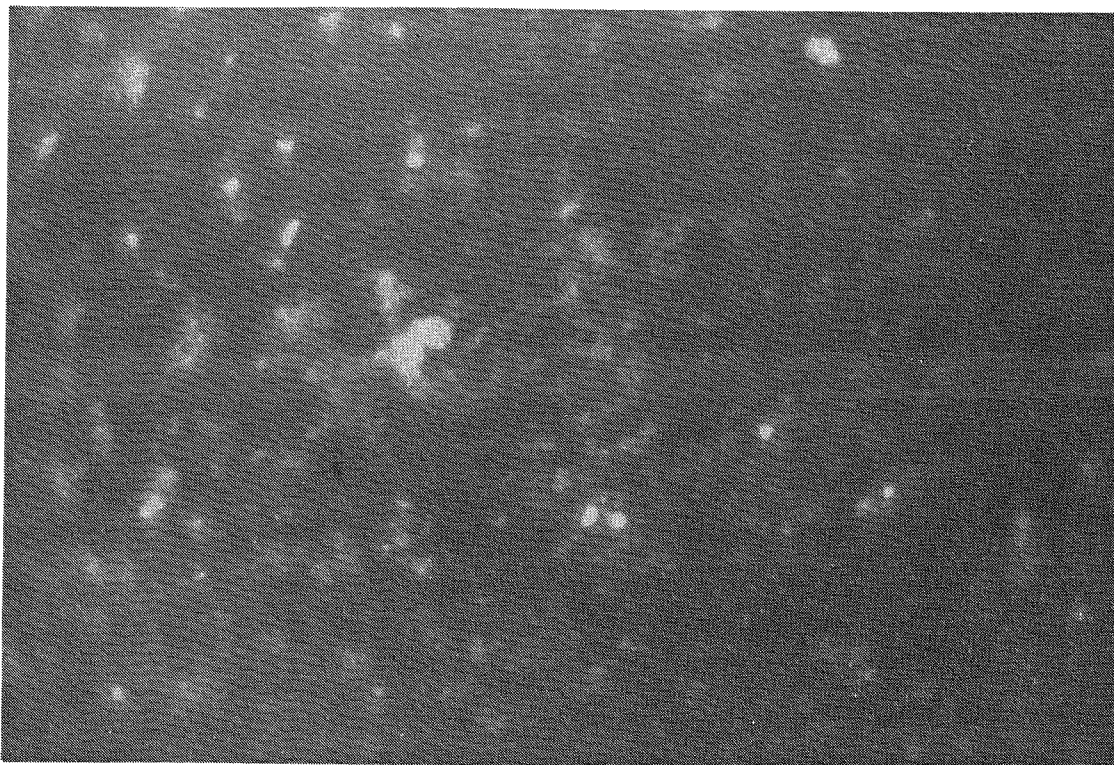


Figure IV-23 : Marquage spécifique de *R. chlorophenolicus* par le sérum immunologique

Le marquage pariétal est nettement meilleur que celui obtenu avec les quatre souches sélectionnées dans la première partie du travail.

La microflore totale du sol a été dénombrée après marquage non spécifique à l'acridine orange.

IV-3-1-2 Survie de *R. chlorophenolicus* en microcosmes de sol non stérile

Avant d'introduire la souche de *R. chlorophenolicus* dans le sol cultivé non stérile, nous avons vérifié avec les sérums si cette souche y était naturellement présente. Les résultats ont montré qu'elle semblait absente de ce sol ou, si elle est présente, c'est à un niveau inférieur au seuil de détection de la méthode employée (environ 10^4 cellules.g⁻¹ de sol sec).

Au cours de cette étude, nous avons suivi la cinétique de survie de *R. chlorophenolicus* ainsi que celle de la microflore indigène totale. Les résultats sont présentés figure IV-24 :

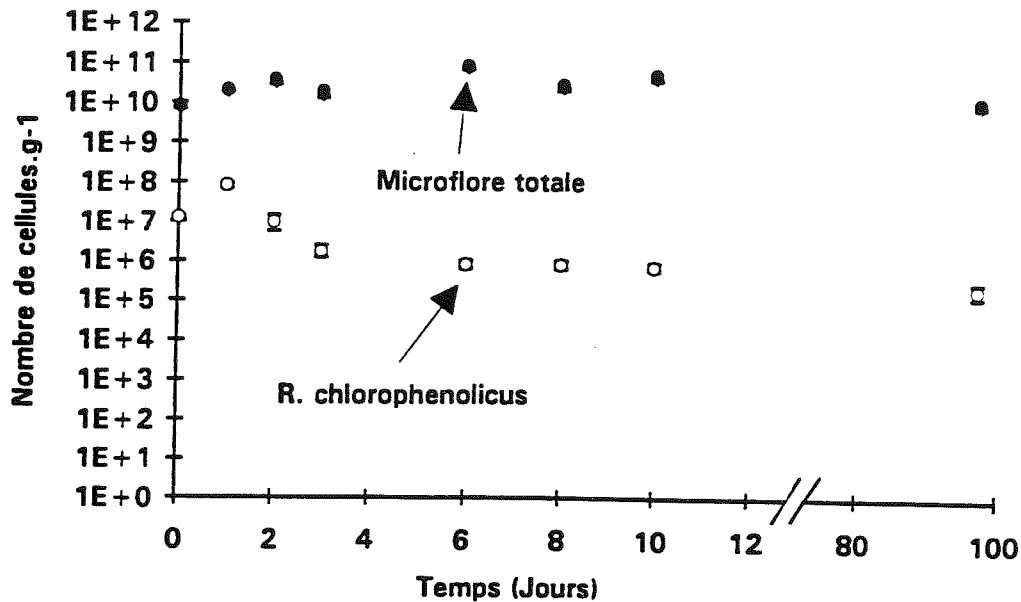


Figure IV-24 : Dynamique d'une population de *R. chlorophenolicus* et de la microflore indigène en sol non stérile

On peut observer sur cette figure que la microflore indigène du sol se stabilise à une valeur d'environ 10^{10} cellules.g⁻¹ de sol sec.

En ce qui concerne *R. chlorophenolicus*, la population se stabilise à environ 10^6 cellules.g⁻¹ après avoir atteint un niveau d'environ $9 \cdot 10^7$ cellules.g⁻¹ un jour après l'inoculation. Le niveau de population à l'équilibre semble stable au moins sur une période de quatre mois.

IV-3-2 Discussion

Les résultats ont permis de montrer que la souche de *R. chlorophenolicus* était capable de se maintenir dans le sol de la Côte Saint André à un niveau suffisamment élevé pour que l'on puisse espérer observer la biodégradation du PCP *in situ*.

En effet, ce niveau de population est proche de celui observé par Middeldorp (1990) pour cette souche dans un sol limono-sableux contaminé avec $630 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sol sec et qui a conduit à un taux de minéralisation de 130 à $250 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sol sec en quatre mois. Ce taux correspond à une vitesse de dégradation de $6,6 \cdot 10^{-16}\text{g}$ de

PCP.h⁻¹.cellules⁻¹ qui est du même ordre de grandeur que celui que nous avons obtenu.

En ce qui concerne la microflore totale du sol, on constate que le niveau d'équilibre est relativement élevé compte tenu de la faible teneur en matière organique du sol de La Côte Saint André. Les résultats obtenus par mesure indirecte (UFC) (qui permet de dénombrer les cellules viables) sont nettement inférieurs puisqu'on ne dénombre qu'environ 10⁷ cellules.g⁻¹ de sol sec. Des mesures de biomasse (Jocteur Monrozier com. perso.) ont néanmoins confirmé les résultats obtenus par dénombrement direct.

Ce type de résultat est classiquement rencontré dans de nombreux sols (Paul & Clark 1989) où l'on observe le plus souvent une différence d'un facteur 100 entre les deux techniques alors que nous observons une différence d'un facteur 1000. Cette différence est due au fait que la technique de dénombrement sur boîte ne permet de dénombrer que les microorganismes capables de croître sur un milieu synthétique riche, ce qui ne semble pas être une généralité dans le sol (Paul & Clark 1989).

La différence observée entre les niveaux d'équilibre de la population de *R. chlorophenolicus* dans le sol stérile (5. 10⁷ cellules.g⁻¹ de sol) et le sol non stérile (10⁶) met en évidence le phénomène de régulation des populations microbiennes par la prédation et la compétition pour les substrats ou les microniches favorables au développement cellulaire. Ce phénomène a déjà été largement observé lors de réintroductions de microorganismes dans les sols (Steinberg 1987, Ramirez & Alexander 1980, Recorbet 1993, Thies et al 1991).

Les résultats obtenus avec le sol non stérile sont encore peu nombreux en raison essentiellement de la lourdeur des manipulations à entreprendre et surtout de l'obtention relativement tardive de la souche de référence ainsi que de son sérum spécifique. Certaines études développées dans ces conditions sont envisagées et devraient permettre d'obtenir des données de base sur l'effet des xénobiotiques sur le fonctionnement microbien en conditions naturelles.

Par exemple, l'étude de l'effet du PCP sur la survie de *R. chlorophenolicus* en présence de la microflore indigène semble particulièrement intéressant à développer. Ces expérimentations pourraient permettre de mettre en évidence un éventuel avantage pour cette souche avec la présence du xénobiotique par rapport à la microflore indigène, ainsi que son effet toxique sur cette dernière. Les résultats obtenus dans la

première partie, ne permettent cependant pas d'attendre un quelconque effet en raison des faibles concentrations utilisées.

IV-4 Devenir de *R. chlorophenolicus* en colonnes de sol

Les études menées en microcosmes permettent d'obtenir des connaissances de base sur le comportement des microorganismes en conditions d'équilibre. Comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre, le sol est un système ouvert, rarement à l'équilibre, et parcouru par des fluides.

L'étude du comportement des microorganismes dans les sols ne sera complète qu'avec la prise en compte des phénomènes dynamiques responsables en particulier de l'activité et du mouvement des microorganismes. Pour cela, des études menées en colonnes nous ont paru indispensables, notamment pour cerner les problèmes de devenir de populations introduites sous l'effet, par exemple, du transport vertical.

IV-4-1 Les conditions expérimentales

IV-4-1-1 Inoculation du sol

Le sol utilisé pour cette étude est le sol de La Côte Saint André stérilisé et non stérilisé.

Comme pour les microcosmes, le sol a été inoculé par une suspension aqueuse dont la densité de population a été adaptée par dilution pour obtenir un inoculum de 10^7 cellules.g⁻¹, contrôlée par la mesure de la turbidité.

Nous avons suivi deux protocoles d'inoculation différents, l'un consistant à introduire la souche sous forme d'un levain en tête de colonne et l'autre à introduire la souche sur tout le profil du sol.

Dans le premier cas, le levain était constitué du sol de trois microcosmes obtenus précédemment lors de l'étude en sol stérile après quatre mois d'équilibre, ce qui correspond à une masse de 12,6 g de sol sec contenant environ $5 \cdot 10^7 \times 12,6 = 6,3 \cdot 10^8$ cellules.

Dans le deuxième cas, l'inoculation a été effectuée en pulvérisant la suspension bactérienne sur le sol étalé sur une surface stérile. Après

homogénéisation, le sol a été introduit dans la colonne et incubé pendant une semaine à température ambiante, permettant ainsi à la population de *R. chlorophenolicus* d'atteindre son niveau d'équilibre de $5 \cdot 10^7$ cellules.g-1 pour le sol stérile et 10^6 cellules.g-1 pour le sol non stérile. On connaît ainsi le nombre théorique total de cellules présentes dans les colonnes après équilibre.

En ce qui concerne le premier mode d'inoculation du sol, il n'a été effectué qu'avec le sol stérile pour mettre en évidence un éventuel mouvement des cellules dans la colonne avec l'eau de percolation.

IV-4-1-2 Les colonnes de sol

Les colonnes de sol utilisées pour cette étude sont des colonnes Pharmacia en verre de 2,6 cm de diamètre avec une jaquette de thermostatisation. Les tubulures ont un diamètre de 1 mm permettant de réduire au maximum les volumes morts et donc de connaître avec précision le volume infiltré.

Le sol est mis en place dans la colonne selon le protocole décrit dans l'annexe 2. On obtient ainsi des colonnes de sol d'environ 20 cm avec une densité sèche très reproductible de $1,3 \text{ g.cm}^{-3} \pm 0,05$ (annexe 12).

Les colonnes de sol après saturation en eau et mise en équilibre du sol avec cette solution sont soumises à un écoulement permanent comme décrit au paragraphe V B-1-2.

Dans le cas de l'inoculation par un levain en tête de colonne, la mise en équilibre est effectuée avant l'introduction des microorganismes.

IV-4-1-3 Extraction et dénombrement des microorganismes

Après le passage d'un créneau de concentration en PCP de 50 mg.l^{-1} , pendant des temps variables, le sol est extrait des colonnes et les carottes ainsi obtenues sont alors découpées en 10 morceaux d'environ 2 cm correspondant approximativement à 14 g de sol sec.

Une partie de cette masse de sol est utilisée pour la mesure de la teneur en eau, et le reste est utilisé pour les dénombrements. Ceux ci ont été effectués uniquement par les techniques d'immunofluorescence après avoir vérifié toutefois que les dénombrements de *R. chlorophenolicus* en sol

stérile étaient identiques par les techniques directes et indirectes (lors des premières études, les dénombrements avaient été effectués par comptage sur boîte de Petri).

Par contre, les dénombrements effectués dans l'eau de percolation en sortie de colonne, ont été effectués par la technique indirecte (UFC) après dilution.

IV-4-2 Résultats

IV-4-2-1 Evaluation du transport de *R. chlorophenolicus* par l'eau de percolation

Après avoir fait percoler la solution de PCP à 50 mg.l^{-1} pendant 12 volumes de pore à travers la colonne de sol (L5), le profil du niveau de population de *R. chlorophenolicus* a été déterminé (figure IV-25). Les dénombrements effectués dans la solution du sol ont montré qu'aucune cellule n'atteignait le bas de la colonne (à la limite de détection près).

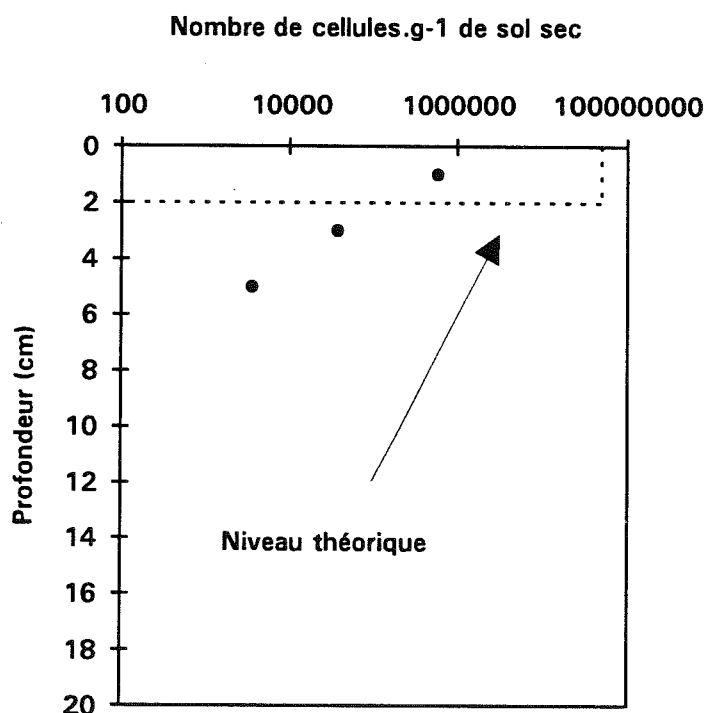


Figure IV-25 : Profil de la population de *R. chlorophenolicus* dans une colonne de sol stérile après percolation de 12 volumes de pore d'une solution de PCP à 50 mg.l^{-1} (colonne L5)

La figure IV-25 montre que dans ces conditions expérimentales, et malgré la saturation en eau, donc un potentiel hydrique faible, les cellules de *R. chlorophenolicus* ne migrent pas le long du sol.

De plus, on observe que le niveau de population est nettement inférieur à celui observé en microcosmes, mettant ainsi en évidence soit, l'effet de la saturation en eau du sol qui n'a pas été observée en microcosmes, soit l'effet de la concentration en PCP (50 mg.l^{-1}).

IV-4-2-2 Evolution de la distribution verticale de *R. chlorophenolicus* au cours du transfert de PCP

Les résultats des essais de transfert de PCP dans les colonnes de solensemencées avec *R. chlorophenolicus* sur tout le profil sont présentés dans le chapitre V. En ce qui concerne l'évolution de la population de la souche introduite, les résultats sont présentés dans les figures IV-26 et IV-27. Ils ont été obtenus sur sol stérile (colonne L6) et non stérile (colonne L3) lors d'injection d'une solution de PCP à 50 mg.l^{-1} pendant 14 et 15 volumes de pore respectivement, après une percolation de 22 et 18 volumes de pore.

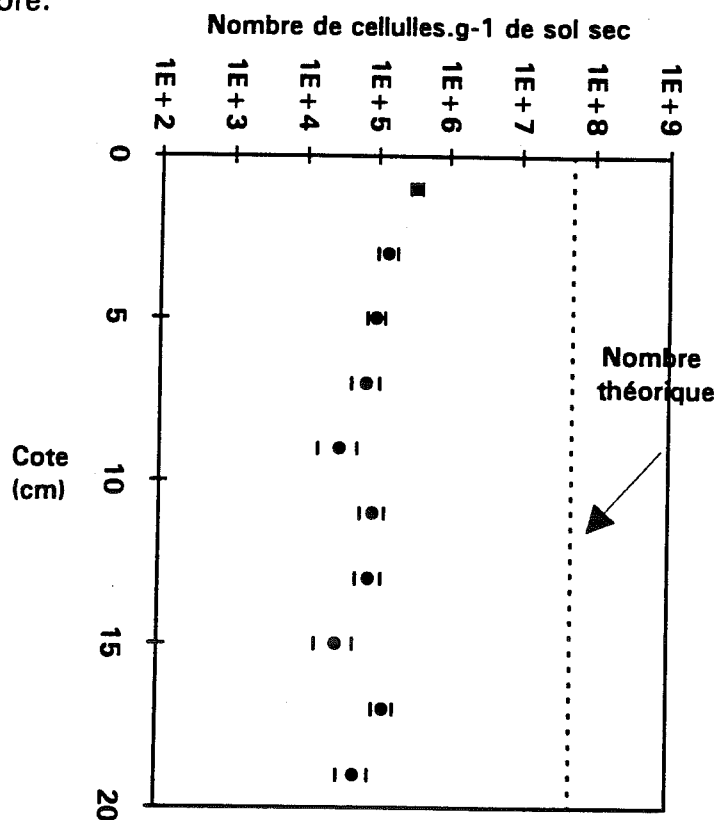


Figure IV-26 : Evolution de la distribution de *R. chlorophenolicus* en colonne de sol stérile après écoulement d'une solution de PCP à 50 mg.l^{-1} pendant 14 volumes de pore (colonne L6) (22 jours)

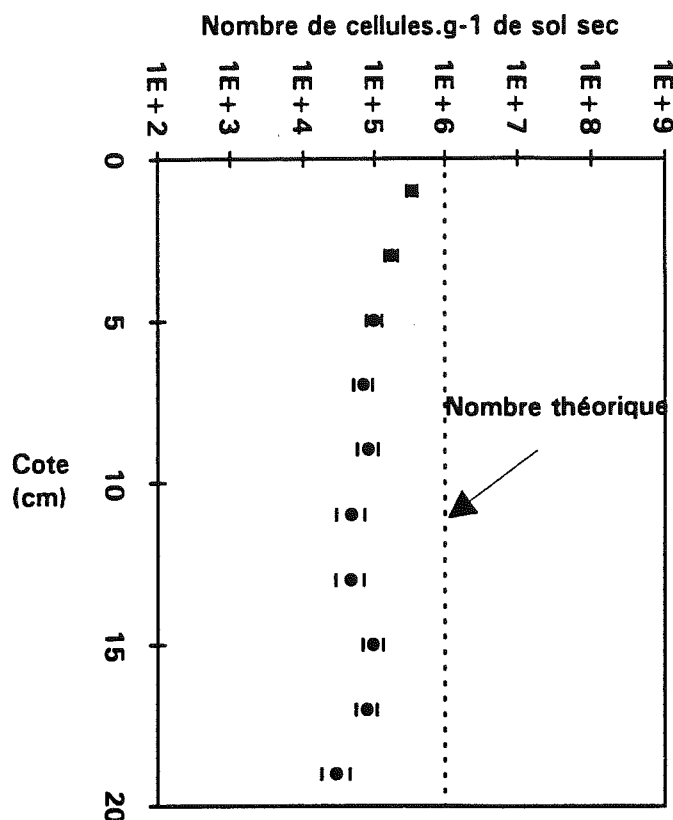


Figure IV-27 : Evolution de la distribution de *R. chlorophenolicus* en colonne de sol non stérile après écoulement d'une solution de PCP à 50 mg.l^{-1} pendant 15 volumes de pore (colonne L3) (18 jours)

On peut observer sur ces figures que les niveaux de population observés, excepté sur le haut des colonnes, sont inférieurs à ceux observés en microcosmes d'un facteur 100 d'environ pour le sol stérile et 20 pour le sol non stérile. Comme dans le cas précédent, ces différences semblent mettre en évidence l'effet négatif de la saturation en eau ou de la concentration en PCP sur le niveau de population.

IV-4-3 Discussion

Les résultats obtenus lors des études d'introduction de *R. chlorophenolicus* en conditions dynamiques ont permis de montrer en particulier que cette souche n'est pas transportée à travers le sol.

Ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour d'autres organismes par Madsen et Alexander (1982) qui n'observent qu'un transfert de 2,7 cm de souches de *Rhizobium japonicum* et de *Pseudomonas putida*.

Ce résultat est néanmoins surprenant, dans la mesure où le sol était saturé en eau (50% volumique) et que les cellules se trouvaient en majorité dans le compartiment externe du sol, donc plus facilement en contact avec l'eau mobile. Dans des conditions analogues, Van Elsas (1991) a montré qu'une forte teneur en eau favorisait le transport d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* qui pouvait atteindre 50 cm de profondeur.

Toutefois certains auteurs ont montré que le transport des cellules bactériennes dans le sol dépendait non seulement des conditions hydriques, mais aussi des propriétés du sol : conductivité hydraulique, vitesse de pore, teneur en eau, et des propriétés des cellules : hydrophilie, hydrophobie, mobilité (Huysman & Verstaete 1993, Marlow et al. 1991).

Par ailleurs, nous avons pu observer que le niveau de population de *R. chlorophenolicus* était inférieur à celui obtenu en microcosmes, ce qui peut s'expliquer par le fait que le sol était saturé en eau ou par l'effet toxique du PCP.

Les résultats obtenus en microcosmes concernant l'effet de la teneur en eau, n'ont pas permis de mettre en évidence un effet quelconque, ce qui peut s'expliquer éventuellement par la taille des microcosmes qui fait que malgré la saturation en eau, on avait quand même une diffusion des gaz vers les agrégats.

Dans les colonnes, au contraire, aucune entrée des gaz n'est possible (ou très faible) ce qui peut expliquer le bas niveau de population observé dans cette expérience et avec les colonnes de solensemencées sur tout le profil, où l'on a pu observer les mêmes niveaux de population : environ 10^5 cellules.g⁻¹.

Le fait d'obtenir un nombre de cellules plus élevé sur le haut des colonnes semble confirmer l'hypothèse de la régulation du niveau de population de *R. chlorophenolicus* par la teneur en eau qui limite la diffusion de l'oxygène indispensable à sa survie.

En effet, l'entrée de la solution du sol (non désaérée) se faisant par le haut de la colonne, il est normal que les cellules présentes dans les premiers centimètres du sol soient plus actives car utilisant l'oxygène dissous. L'oxygène ainsi consommé ne sera plus disponible pour le reste des cellules, d'où un profil assez homogène jusqu'au bas de la colonne.

Ainsi la distribution du microorganisme introduit ne correspond pas à une migration de cellules qui se traduirait par une accumulation de bactéries à la base de la colonne. L'apparente similitude avec la distribution des microorganismes dans certains profils de sol (figure III-1) provient en fait de la similitude de l'inoculation des microorganismes.

Des essais de survie de *R. chlorophenolicus* en colonnes de sol non saturés en eau, plus représentatives des conditions naturelles devraient être développées par la suite. Ils devraient permettre de vérifier que l'O₂ est un facteur de la localisation ou plutôt du développement préférentiel des populations bactériennes car on sait qu'en anaérobiose, la biosynthèse est très réduite.

Un effet de la concentration en PCP sur le niveau de population de *R. chlorophenolicus* semble peu probable compte tenu des résultats obtenus en microcosmes avec une concentration voisine (30 mg.l⁻¹) et surtout de la cinétique de dégradation en milieu liquide à 50 mg.l⁻¹ par cette même souche montrant que cette concentration n'est pas toxique pour ce microorganisme.

D'autre part certains auteurs ont montré que cette bactérie supportait des concentrations en PCP allant au moins jusqu'à 630 ppm, avec lesquelles de forts taux de dégradation étaient observés (Middeldorp 1990, Apajalahti & Salkinoja-Salonen 1986).

La prise en compte des phénomènes dynamiques apporte donc des compléments aux résultats obtenus en systèmes fermés qui ne prennent pas en compte les phénomènes d'écoulement, de diffusion ou de transport de microorganismes. Ces facteurs semblent réguler de manière prépondérante les niveaux des populations microbiennes dans les sols puisque l'on observe les mêmes taux de population dans les sols stériles et non stériles, ce qui peut signifier que les facteurs biotiques (prédation, compétition) ne sont prépondérants que lorsque les facteurs abiotiques ne sont pas limitants, comme c'est généralement le cas en microcosmes.

Il faut noter que la comparaison des résultats obtenus en microcosmes et en colonne, ainsi que leur transposition en systèmes naturels, ne sont possibles que si les paramètres relatifs au sol sont les mêmes. En particulier la densité sèche apparente est un paramètre important car il va influencer d'autres paramètres comme la conductivité hydraulique, la relation pression-teneur en eau, ou encore l'effet dispersif comme nous pourrons le voir au chapitre V-C-2-2.

CONCLUSION

Les objectifs principaux de ce chapitre étaient d'une part, de mettre en évidence le phénomène d'adaptation des microorganismes à la dégradation d'une molécule xénobiotique qui devait nous conduire à l'obtention de bactéries compétentes pour la dégradation du produit en question, et d'autre part, d'utiliser une de ces bactéries pour caractériser et estimer les paramètres les plus pertinents susceptibles d'être utilisés dans la modélisation mathématique de la biodégradation.

L'utilisation d'un système d'enrichissement qui s'est avéré stable au cours du temps et assez représentatif des conditions naturelles, nous a permis de montrer l'existence, dans le sol étudié, de bactéries spontanément capables de dégrader le PCP et qu'il a été possible d'isoler.

Cependant, il ne semble pas qu'il y ait eu de réel enrichissement (au moins en nombre) en microorganismes dégradants. L'étude génétique des souches n'a pas permis de mettre en évidence leur adaptation (acquisition de plasmides). Les souches bactériennes isolées appartiennent à des genres classiquement rencontrés dans ce type d'études : *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. La perte de leur activité de dégradation a permis de soulever le problème de la conservation des microorganismes et de la stabilité plasmidique, et qui nous a conduit par la suite à utiliser une conservation sur milieu solide moins problématique.

En ce qui concerne la deuxième partie des objectifs, compte tenu de la perte d'activité des bactéries sélectionnées, nous avons choisi d'utiliser une souche de *Rhodococcus chlorophenolicus* connue pour ses capacités de dégradation des chlorophénols et son aptitude à survivre dans de nombreux écosystèmes.

Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que cette bactérie présentait des taux de dégradation en milieu liquide suffisants pour envisager son utilisation dans le sol comme agent de remédiation. L'analyse plasmidique de cette bactérie a permis de mettre en évidence l'apparition d'un nouveau plasmide d'environ 45 MDa, lorsque les cellules étaient cultivées en présence de PCP, qui est venu enrichir le stock de plasmides présents dans les cellules cultivées en milieu riche. Une étude plus poussée de ce plasmide semble être un point très intéressant, d'autant plus qu'une des souches isolées au cours de la phase d'enrichissement (Si) présente un plasmide de taille voisine (43 à 48 MDa).

La mise en évidence de l'intervention du plasmide de 45 MDa de *R. chlorophenolicus* dans la dégradation du PCP serait une voie de recherche à développer ainsi que la comparaison de ce plasmide avec celui de la souche Si.

En ce qui concerne les autres paramètres biologiques, pouvant influencer les phénomènes de biodégradation, nous avons pu voir l'importance de la prise en compte des aspects dynamiques dans les études sur le sol.

En particulier, nous avons pu constater des différences dans les résultats obtenus en microcosmes et ceux obtenus en colonnes de sols concernant l'effet de la teneur en eau. L'eau, du moins la saturation n'a pas d'effet significatif en microcosmes dans la gamme de teneurs en eau étudiée, alors qu'en colonnes de sols saturées en eau, le niveau de population est affecté par la limitation de la diffusion des gaz.

En ce qui concerne l'effet de la concentration en PCP, celui ci n'a pu être mis en évidence que pour une concentration de 100 mg.l^{-1} qui ne semble pourtant pas être réellement toxique pour cette bactérie dans le sol (Middeldorp 1990). Ceci nous permettra donc de ne pas prendre en compte les phénomènes d'inhibition par le substrat pour la suite de l'étude.

Les études menées avec le sol non stérile ont permis de montrer que les cellules de *R. chlorophenolicus* sont confrontées, dans le sol, aux phénomènes de prédation et de compétition, ce qui affecte le niveau de population à l'équilibre. Il semble cependant, que ces phénomènes biotiques ne sont pas prépondérants lorsque des contraintes abiotiques existent dans le sol, comme l'ont montré les essais en conditions dynamiques.

Ces essais ont également permis de montrer que la bactérie étudiée est très peu transportée par l'eau de percolation, même lorsque les cellules se trouvent dans le compartiment externe du sol (porosité externe).

L'exploitation des résultats concernant l'activité de dégradation de *R. chlorophenolicus in situ* n'a pas pu être effectuée pour des problèmes techniques, cependant le renouvellement de ces expériences est envisagé, ce qui devrait nous permettre de confirmer les résultats obtenus par Middeldorp (1990) avec cette même bactérie.

Le développement de ces expériences en colonnes est également souhaitable, surtout en conditions de non saturation en eau, plus réaliste, et permettant l'activité de dégradation du PCP, *R. chlorophenolicus* étant aérobie stricte.

CHAPITRE V

**TRANSFERTS SUR COLONNES : TRACEUR DE L'ECOULEMENT,
MOLECULE ORGANIQUE, INTERACTIONS ET BIODEGRADATION**

Position du problème et approche suivie

Les transferts de produits chimiques dans les sols s'effectuent, pratiquement, par l'intermédiaire de l'eau, et leur étude doit considérer d'abord la caractérisation de l'hydrodynamique. Les molécules organiques sont sujettes à des interactions avec les matrices solides et avec les microorganismes qui limitent et modifient leur transport à travers le sol. Ces interactions étant elles mêmes très dépendantes des conditions pédoclimatiques, le système à étudier est du type "boîte noire" représentant un milieu polyphasique déformable où il est difficile de contrôler les conditions aux limites et de prédire quel type de mécanisme intervient de manière prépondérante.

Face à ce problème, et afin de donner une représentation satisfaisante des phénomènes, au moins deux échelles d'observation doivent être envisagées (Gaudet & Vauclin 1987).

- L'échelle macroscopique est représentée par un échantillon de sol (microcosme) ou par une colonne de laboratoire. Dans ces systèmes, les interactions et les phénomènes de transfert sont décrits par des relations faisant intervenir des paramètres représentatifs de grandeurs physiques moyennes caractéristiques d'un élément volumique représentatif du sol (EVR).

A cette échelle, la démarche habituelle, basée sur la dynamique des systèmes, consiste à identifier les processus prépondérants et les paramètres pertinents lors de transferts contrôlés de deux types de solutés à travers des colonnes de sol. On caractérise ainsi, soit l'hydrodynamique (le soluté est un traceur de l'écoulement), soit les interactions (figure V-1) (Martins et al. 1992, Schweich & Sardin 1981).

- L'échelle microscopique (le pore), est supposée grande devant les dimensions moléculaires. A cette échelle, le milieu poreux peut être considéré comme un ensemble de milieux continus complexes et inter-dépendants. C'est à cette échelle qu'est recherchée la compréhension fine des mécanismes fondamentaux impliqués (figure V-2).

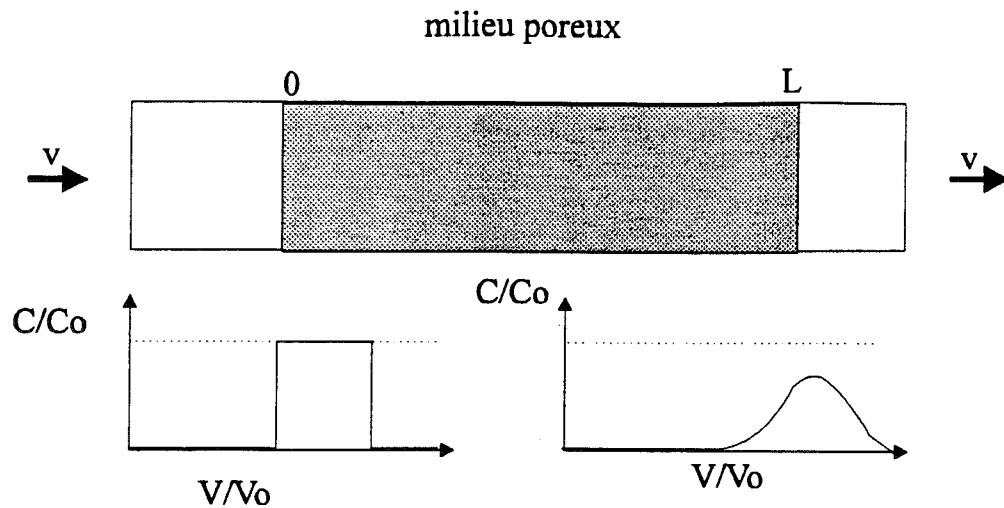
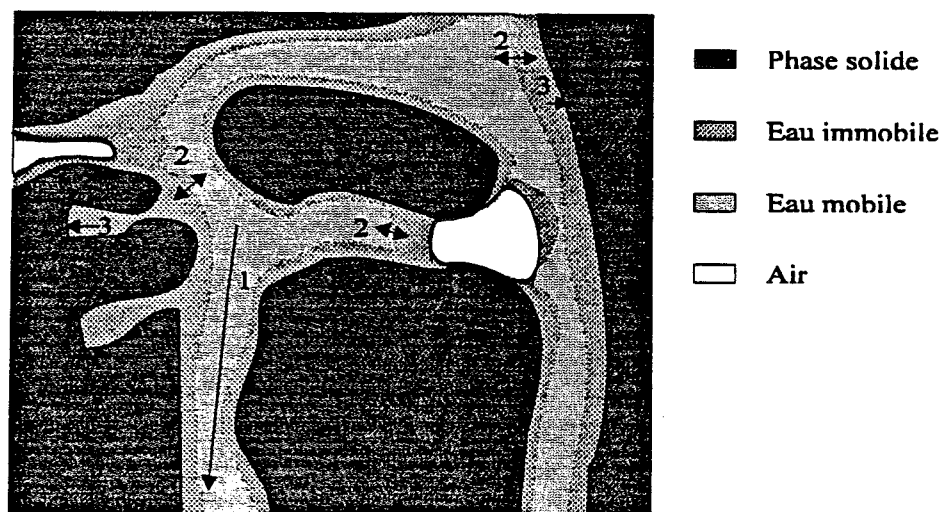


Figure V-1 : Etude à l'échelle macroscopique : identification et caractérisation des principaux mécanismes lors de transferts de solutés en colonnes de sols.



- 1 : Transport par convection
2. Dispersion hydrodynamique avec échange eau mobile-eau immobile et diffusion vers l'eau piégée dans les agrégats et par des bulles d'air
3. Fixation instantanée ou cinétique sur les surfaces (adsorption réversible et/ou irréversible) et dégradation par les microorganismes.

Figure V-2 : Etude à l'échelle microscopique : compréhension et vérification des mécanismes identifiés à l'échelle macroscopique

L'approche générale que nous avons adoptée est basée sur une étude macroscopique en colonnes de sols dont les conditions aux limites sont contrôlées et dont les caractéristiques hydrodynamiques sont obtenues grâce à l'utilisation d'un traceur de l'écoulement (ion chlorure), les caractéristiques physicochimiques étant caractérisées avec le soluté interactif : le PCP.

Afin de bien cerner la part de chaque processus dans le devenir du PCP en colonnes de sol, nous avons tenté de découpler les phénomènes en utilisant des milieux poreux de complexité croissante : un sable supposé inerte, un sol stérile avec matière organique, un sol non stérile, et enfin un sable et un solensemencés avec une population bactérienne dégradant le pesticide modèle.

Grâce à de nombreux aller-retours entre les deux échelles d'observations et en menant en parallèle les expériences et la modélisation, les principaux mécanismes fondamentaux ont pu être identifiés et quantifiés.

A/ CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES TRANSFERTS D'EAU ET DE SOLUTES DANS LES SOLS

L'objectif principal de cette étude étant d'étudier les transferts simultanés d'eau et de PCP dans des colonnes de sols, un certain nombre d'hypothèses de bases doivent être posées afin de préciser le domaine de validité des théories développées dans ce chapitre.

D'abord, nous considérons que les matrices poreuses étudiées sont indéformables, homogènes et isotropes. La phase liquide est continue, isotherme et incompressible. La phase gazeuse, lorsqu'elle est présente, est continue et soumise à la pression atmosphérique en tous points.

L'étude étant menée en colonnes de sols, nous considérons que l'écoulement est unidirectionnel, les diverses grandeurs utilisées ne sont donc rapportées qu'à une coordonnée spatiale (z) prise positive vers le bas. De plus, nous ne nous intéressons qu'aux écoulements permanents et laminaires.

V-1 Modélisation de l'écoulement de l'eau

La modélisation de l'écoulement de l'eau a déjà fait l'objet de nombreux travaux (Gaudet 1978, Mermoud 1982, Musy et Soutter 1991, Thony 1970, Vachaud 1968) aussi bien dans des sols saturés que non saturés (Gaudet & Vauclin 1987, Hillel 1980). Nous ne présenterons qu'une revue très rapide de cette modélisation. Les principales variables sont définies annexe 12.

V-1-1 Conservation de masse de l'eau

La modélisation de l'écoulement de l'eau la plus répandue chez les hydrologues est basée sur l'équation de continuité qui exprime la conservation de masse du fluide dans le milieu :

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = - \frac{\partial q}{\partial z} \quad (V-1)$$

avec θ = teneur volumique en eau ($\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$)

q = densité de flux volumique (cm.h^{-1})

z = coordonnée spatiale, prise positive vers le bas et dont l'origine est choisie à la surface du sol (cm)

Cette équation traduit l'égalité entre la différence des masses entrante et sortante d'un élément volumique représentatif (EVR) pendant un intervalle de temps et la variation de la masse dans l'EVR pendant le même intervalle de temps.

V-1-2 L'équation dynamique

L'équation dynamique est représentée par la loi de Darcy généralisée (relation phénoménologique) :

$$q = -K(\theta) \frac{\partial H(\theta)}{\partial z} \quad (\text{V-2})$$

avec K = conductivité hydraulique du sol qui dépend de sa teneur en eau (cm.h^{-1})

H = charge hydraulique (potentiel total créant l'écoulement) (cm)

La loi de Darcy exprime la proportionnalité entre le flux d'eau et le gradient de potentiel auquel est soumise cette eau et qui provoque son mouvement. En ne considérant que les potentiels capillaires et gravitaires, le "moteur" des transferts d'eau se réduit à la charge hydraulique (H) qui est définie par :

$$H = h(\theta) - z \quad (\text{V-3})$$

avec h = pression de l'eau du sol exprimée en hauteur d'eau par rapport à la pression atmosphérique et qui dépend de la teneur en eau du sol.

La loi de Darcy devient alors, dans le cas monodimensionnel :

$$q = -K(\theta) \left[\frac{\partial h(\theta)}{\partial z} - 1 \right] \quad (\text{V-4})$$

Cette relation fait apparaître un terme capillaire : (h) et un terme gravitaire (1) responsables du mouvement de l'eau.

V-1-3 Equation générale de l'écoulement de l'eau

L'équation de l'écoulement de l'eau est obtenue en introduisant l'équation dynamique dans l'équation de conservation de masse, soit :

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[K(\theta) \left(\frac{\partial h}{\partial z} \right) - 1 \right] \quad (V-5)$$

On voit donc qu'en plus des équations de continuité et de Darcy, des caractéristiques intrinsèques au milieu poreux considéré sont indispensables pour pouvoir représenter l'écoulement de l'eau dans les sols : les relations $K(\theta)$ et $h(\theta)$.

Ces caractéristiques sont indispensables pour quantifier les variations spatio-temporelles des teneurs en eau et des flux, surtout pour les études de terrain où les conditions aux limites varient constamment (Kengni 1993).

V-1-4 Le domaine d'étude

Seuls les cas d'écoulements d'eau en régime permanent avec un flux et une teneur en eau constants sont étudiés dans ce travail.

Ces conditions sont relativement faciles à obtenir en conditions de saturation en eau, en revanche, dans les sols non saturés, pour avoir un profil de teneur en eau constant dans les colonnes, il faut que q et h soient compatibles.

Ces conditions sont obtenues en utilisant les relations $K(\theta)$ et $h(\theta)$ déterminées avec le sable (figures V-3 et V-4) qui permettent de calculer les valeurs de q (face supérieure de la colonne) et de h (extrémité inférieure) à appliquer simultanément pour obtenir une teneur en eau déterminée.

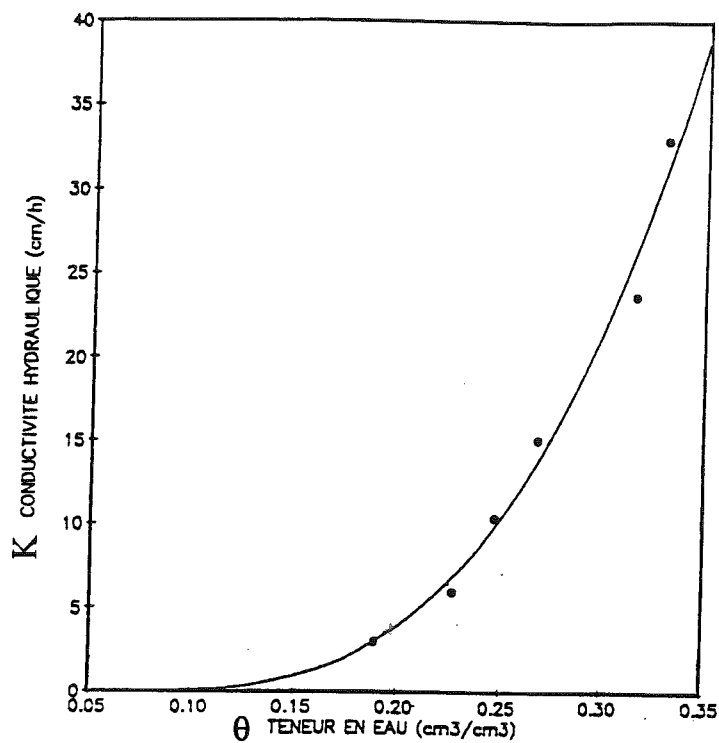


Figure V-3 : Conductivité hydraulique du sable de Fontainebleau en fonction de la teneur en eau ($K(\theta)$)

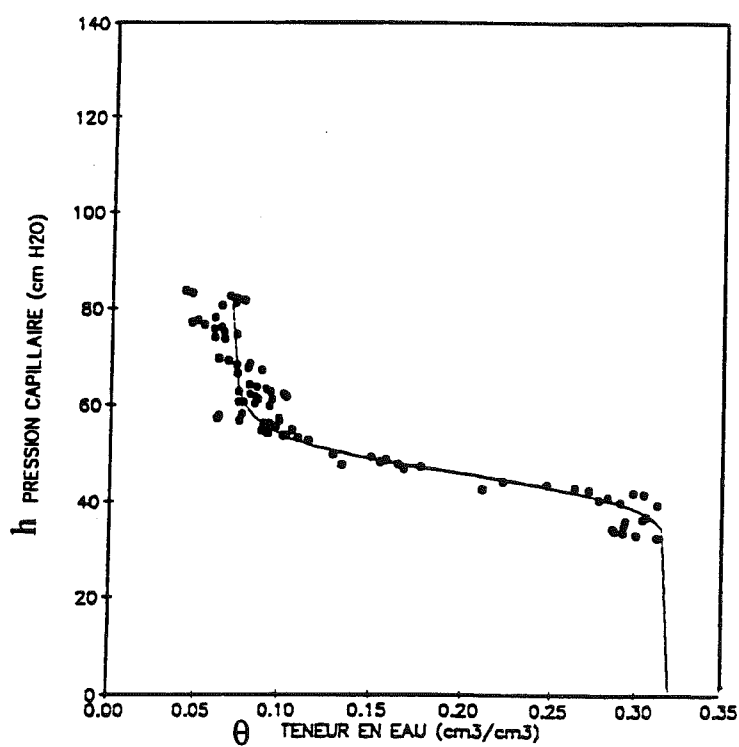


Figure V-4 : Pression capillaire du sable de fontainebleau en fonction de la teneur en eau ($h(\theta)$)

Ces courbes $h(\theta)$ et $K(\theta)$ ont fait l'objet d'un ajustement de paramètres en utilisant l'algorithme de Marquardt, selon les modèles de Van Genuchten (1980) pour $\theta(h)$:

$$\theta(h) = \theta_r + \frac{\theta_s - \theta_r}{\left[1 + \left(\frac{h}{hg}\right)^n\right]^m} \quad (V-6)$$

$$\begin{aligned} \theta_s &= 0,32 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3} \\ \theta_r &= 0,0698 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3} \\ hg &= 45,4735 \text{ cm} \\ m &= 0,8552 \\ n &= 2/(1-m) \end{aligned}$$

et de Brooks et Corey (1964) pour $K(\theta)$:

$$K(\theta) = K_s + \left(\frac{\theta - \theta_r}{\theta_s - \theta_r}\right)^\beta \quad (V-7)$$

$$\begin{aligned} K_s &= 27,7439 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1} \\ \beta &= 3,0212 \\ \theta_r &= 0,0698 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3} \\ \theta_s &= 0,32 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3} \\ h &\text{ est exprimé en cm et K en cm} \cdot \text{h}^{-1} \end{aligned}$$

V-2 Modélisation du transfert de solutés

La modélisation du transfert de solutés dans les sols, la plus généralement utilisée, est basée sur le modèle convectif-dispersif (Gaudet et Vaucelin 1987, Mermoud 1982, Gaudet 1978) selon lequel la variation du stock de soluté correspond à la somme des flux de transfert de soluté par dispersion et par convection soit :

$$\frac{\partial C \theta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left(\theta D \frac{\partial C}{\partial z} \right) - \frac{\partial q C}{\partial z} \quad (V-8)$$

avec C = concentration en soluté dans la phase liquide ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
 D = coefficient de dispersion ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)

La dispersion du soluté dans le milieu poreux représente l'étalement du front de migration du soluté par diffusion moléculaire et par dispersion hydrodynamique. La diffusion moléculaire est due à l'effet du gradient de concentration existant dans la solution alors que la dispersion hydrodynamique représente l'effet de la géométrie et de la taille des pores, du profil des vitesses dans les pores et des lignes de courants pouvant s'écarter de la direction principale d'écoulement (Fried & Combarous 1971, Gaudet 1978).

L'équation V-8 peut être complétée pour inclure les interactions et les réactions chimiques et biologiques et on obtient l'équation plus générale du transfert d'un soluté, dans le cas où toute l'eau coule à une même vitesse (Gaudet et Vauclin 1987):

$$\underbrace{\frac{\partial \rho_d S_i}{\partial t}}_{(1)} + \underbrace{\frac{\partial \theta C_i}{\partial t}}_{(2)} = \underbrace{\frac{\partial}{\partial z} \left(\theta D \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)}_{(3)} - \underbrace{\frac{\partial (q C_i)}{\partial z}}_{(4)} + \underbrace{\sum_j \phi_j^i(C_i, S_i, \dots)}_{(5)} \quad (V-9)$$

avec S_i = concentration de l'élément i dans la phase solide (g.g^{-1})

C_i = concentration de l'élément i dans la solution (g.cm^{-3})

ρ_d = masse volumique sèche du sol (g.cm^{-3})

ϕ_j^i = terme de source/ puits ($\text{g.cm}^{-3}.\text{h}^{-1}$)

Dans cette équation, les différents termes du bilan de masse représentent respectivement :

(1) le taux d'accumulation (ou disparition) de l'élément i dans la phase solide

(2) le taux d'accumulation (ou disparition) de l'élément i dans l'eau

(3) le transport de masse par dispersion

(4) le transport par convection (la vitesse moyenne de l'eau dans les pores est : $v = q/\theta$)

(5) les apports (ou consommations) de l'élément i (action des racines, réactions chimiques, évaporation, précipitation, adsorption irréversible, dissolution, biodégradation...)

V-3 Caractérisation de l'hydrodynamique

Pour un traceur, le terme (1) de l'équation (V-9) est nul.

Des études antérieures (Gaudet et al 1977) ont montré que toute l'eau du sol ne participe pas à l'écoulement (piégeage par capillarité, microporosité des agrégats...).

La modélisation de la distribution continue transversale des vitesses dans les pores est simplifiée et décrite par une distribution bimodale : une partie de l'eau coule à vitesse constante dans une fraction mobile de la teneur en eau (θ_m), le reste de l'eau étant immobile (θ_{im}). On obtient ainsi:

$$\theta_m + \theta_{im} = \theta \quad (V-10)$$

avec θ_m = teneur volumique en eau mobile ($\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$)
 θ_{im} = teneur volumique en eau immobile ($\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$)

et $V_m = q / \theta_m \quad (V-11)$

avec V_m = vitesse moyenne de l'eau mobile (cm.h^{-1}).

Cette partition de l'eau est primordiale dans le cas des sols non saturés où une partie importante de l'eau est piégée, notamment par des bulles d'air.

L'équation de conservation de masse (V-8) peut être écrite pour un traceur en partitionnant l'eau en deux fractions et pour un régime d'écoulement permanent unidimensionnel :

$$\theta_m \frac{\partial C_m}{\partial t} + \theta_{im} \frac{\partial C_{im}}{\partial t} = \theta_m D_m \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2} - \theta_m V_m \frac{\partial C_m}{\partial z} \quad (V-12)$$

avec C_m = concentration en traceur dans l'eau mobile (g.cm^{-3})
 C_{im} = concentration en traceur dans l'eau immobile (g.cm^{-3})

On suppose que la dispersion mécanique dans la fraction immobile est négligeable ($D_{im} = 0$).

L'échange de matière entre fractions mobile et immobile a lieu par diffusion moléculaire, il est modélisé par une cinétique du premier ordre (Coats & Smith 1964) :

$$\theta_{im} \frac{\partial C_{im}}{\partial t} = \alpha (C_m - C_{im}) \quad (V-13)$$

avec α = coefficient d'échange de matière (h^{-1}).

L'écoulement d'eau étant fixé en régime permanent, les variables q et θ sont imposées par les conditions expérimentales. L'hydrodynamique est donc paramétrisée par les coefficients : θ_m , D_m et α . Ces paramètres sont identifiés sur les courbes de réponse d'une colonne de sol sollicitée par un créneau de traceur.

La caractérisation expérimentale de l'effet de l'écoulement d'eau sur un soluté, est faite en utilisant des molécules chimiques ne présentant pas d'interactions avec les matrices solides. Elles sont donc sensées représenter le comportement des molécules d'eau au cours du transfert dans le sol (Nielsen et al. 1986).

Le meilleur traceur possible de l'écoulement est la molécule d'eau elle-même (dans la mesure où elle peut être suivie), ce qui peut être le cas pour l'eau tritiée. Outre les possibilités non nulles de fixation du tritium, la lourdeur des manipulations à mettre en oeuvre pour l'utilisation d'isotopes et leur coût fait que généralement on utilise des ions minéraux plus commodes d'utilisation, du type iodure, ou chlorure, sous diverses formulations.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi d'utiliser l'ion chlorure sous la forme KCl comme traceur de l'écoulement, essentiellement pour des raisons de commodité d'analyse. Nous avons choisi la forme KCl plutôt que NaCl ou CaCl₂ pour s'affranchir d'éventuelles modifications physico-chimiques des sols étudiés, l'ion potassium entraînant moins de perturbations, surtout au niveau des argiles (Jocteur Monrozier comm. perso.), le potassium étant moins échangé avec les argiles des sols étudiés.

Le chlorure de potassium utilisé dans cette étude est un produit pour analyses Prolabo Normapur. Les solutions de KCl ont été préparées avec de l'eau distillée ou déminéralisée. La concentration choisie est de 1 g.l^{-1} correspondant à une solution à $13,4 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Les expérimentations de traçage dans les colonnes de sol ont nécessité l'utilisation de solutions équilibrées chimiquement avec la phase solide.

Les analyses de chlorures des solutions utilisées au cours de l'étude ont été faites en routine par titration au nitrate d'argent selon la méthode de Mohr simplifiée (annexe 13).

Les analyses fines de solutions de chlorures ont été effectuées au laboratoire d'analyse de traces de Rhône Poulenc Pont de Claix par chromatographie liquide haute pression (CLHP) avec détection ionique, ainsi qu'au Service Central d'Analyse (SCA) du CNRS par chromatographie ionique.

V-4 Caractérisation des interactions du soluté avec la matrice solide

Dans le cas d'un soluté i interactif avec la matrice solide, on définit une fraction f' ($0 \leq f' \leq 1$) de solide en contact avec la fraction d'eau mobile et $1-f'$ en contact avec la fraction immobile.

Ceci conduit à la transformation de l'équation V-12 en :

$$\theta_m \frac{\partial C_m}{\partial t} + \theta_{im} \frac{\partial C_{im}}{\partial t} + \rho_d (1-f') \frac{\partial S_{im}}{\partial t} + \rho_d f' \frac{\partial S_m}{\partial t} = \theta_m D_m \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2} - \theta_m V_m \frac{\partial C_m}{\partial z} + \sum_j \phi_j^i \quad (V-14)$$

avec S_m = concentration en soluté dans la phase solide en contact avec l'eau mobile (g.g^{-1})

S_{im} = concentration en soluté dans la phase solide en contact avec l'eau immobile (g.g^{-1})

De même, l'équation V-13 devient :

$$\theta_{im} \frac{\partial C_{im}}{\partial t} + (1-f') \rho_d \frac{\partial S_{im}}{\partial t} = \alpha (C_m - C_{im}) \quad (V-15)$$

En considérant que la fixation du soluté est instantanée et que l'équilibre est linéaire, on écrit :

$$S_m = K C_m \quad (V-16a)$$

$$S_{im} = K C_{im} \quad (V-16b)$$

où K est le coefficient de partage liquide-solide ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$).

Dans le cas du PCP, au vu des résultats obtenus dans le chapitre II et compte tenu des faibles concentrations utilisées, on peut considérer ces hypothèses comme décrivant son comportement de manière satisfaisante.

Dans ces conditions, les équations V-14 et V-15 deviennent :

$$(\theta_m + f' \rho_d K) \frac{\partial C_m}{\partial t} + (\theta_{im} + (1 - f') \rho_d K) \frac{\partial C_{im}}{\partial t} = \theta_m D_m \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2} - \theta_m V_m \frac{\partial C_m}{\partial z} + \sum_j \phi_j^i \quad (V-17)$$

et

$$(\theta_{im} + (1 - f') \rho_d K) \frac{\partial C_{im}}{\partial t} = \alpha (C_m - C_{im}) \quad (V-18)$$

La prise en compte de phénomènes tels que les réactions chimiques, la biodégradation ou la précipitation qui conduisent à une disparition du soluté (se traduisant par un taux de récupération < 1) se fait par l'intermédiaire du terme puits/source de l'équation V-17 : $\sum \phi_j^i$

La majorité des auteurs considère les réactions de disparition ou de consommation comme étant d'ordre 0 ou 1 (Van Genuchten & Wagenet 1989, Novy Quadri 1993, Chen et al. 1992, Richter et al. 1993).

Cette modélisation est extrêmement grossière puisque des processus aussi complexes que la biodégradation, le transport particulaire ou encore la précipitation-dissolution sont représentés de manière simpliste et indifféremment par un même paramètre.

L'équation V-19 est écrite, en ne considérant que la cinétique de dégradation du premier ordre :

$$(\theta_m + f' \rho_d K) \frac{\partial C_m}{\partial t} + (\theta_{im} + (1 - f') \rho_d K) \frac{\partial C_{im}}{\partial t} = \theta_m D_m \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2} - \theta_m V_m \frac{\partial C_m}{\partial z} + \theta_m \mu_d C_m + \theta_{im} \mu_d C_{im} \quad (V-19)$$

où μ_d (h^{-1}): représente indifféremment de la biodégradation, de la dégradation chimique ou toute réaction hétérogène (précipitation...).

Ce paramètre n'intervient que dans la mesure où le taux de récupération du soluté est différent de 1.

Le soluté interactif est le PCP. Ses caractéristiques essentielles ont été présentées dans le chapitre II. Pour les essais sur sable, le PCP est préparé dans de l'eau distillée.

Pour les expérimentations effectuées en colonnes de sol, le PCP n'est ajouté à la solution qu'une fois celle-ci mise en équilibre avec le sol étudié. Pour cela, on effectue une percolation par un volume d'eau (2000ml) à travers la colonne de sol en circuit fermé jusqu'à ce que la conductivité électrique de la solution soit constante. On recueille la fraction de la solution qui est hors de la colonne et on ajoute alors le PCP à la solution du sol de la même manière que pour les solutions préparées avec de l'eau pure. Cette solution servira pour les créneaux d'injection.

Le PCP a été utilisé tout au long de cette étude, à des concentrations de 10, 30, 50 ou 100 mg.l⁻¹. Toutes les expérimentations de mise au point ou de caractérisation ont été effectuées avec une concentration de 10 mg.l⁻¹, soit 37,7 µmol.l⁻¹.

Les méthodes analytiques de mesures de concentration en PCP sont décrites dans le chapitre II.

V-5 Identification des paramètres

Pour un soluté conservatif (au sens où le taux de récupération est égal à 1) la modélisation proposée conduit à identifier numériquement 5 paramètres dimensionnels : θ_m , D_m , α , f' et K . Les coefficients et paramètres connus ou imposés sont : θ , q , ρ_d , C_i , C_0 , L et t_p .

C_i est la concentration initiale constante de l'élément chimique dans l'eau du sol (g.cm⁻³)

C_0 est la concentration imposée dans le créneau d'entrée (g.cm⁻³)

L est la longueur de la colonne (cm)

t_p est la durée du créneau (h)

L'ajustement des courbes de restitution pour un soluté interactif dont le bilan de masse ne s'équilibre pas (taux de récupération $\neq 1$) est effectué en utilisant le modèle mathématique résolu numériquement par Novy Quadri (1993). Ce modèle peut traiter l'équation V-19 (avec $\mu_d \neq 0$), assortie de l'équation V-18 et des conditions initiales et aux limites appropriées.

Le coefficient μ_d , correspondant aux cinquième et sixième termes de l'équation V-19 est défini par :

$$\mu_d = \frac{r}{C} \quad (V-20)$$

avec r = vitesse de réaction ($\text{g.cm}^{-3}.\text{h}^{-1}$)

μ_d = est exprimée en h^{-1}

μ_d est supposé constant dans cette modélisation.

V-5-1 Adimensionnalisation des équations

Dans le but de comparer rapidement et efficacement des résultats obtenus dans différentes conditions d'essais (q , L , C_0 ...) les équations V-17 avec $\sum \phi_j^i = 0$ et V-18 sont adimensionnalisées. On pose :

$$T = \frac{q.t}{\theta} \times \frac{1}{L} = \frac{v.t}{L} = \frac{V_m \theta_m}{\theta.L} t \quad \omega = \alpha. L/q$$

$$Z = z/L \quad C_1 = (C_m - C_i)/(C_0 - C_i)$$

$$\text{Pulse} = v.t_p/L \quad C_2 = (C_{im} - C_i)/(C_0 - C_i)$$

$$P = v_m.L/D_m \quad (\text{nombre de Peclet})$$

$$\beta = \frac{\theta_m + f'.\rho_d.K}{\theta + \rho_d.K}$$

$$R = 1 + \rho_d.K/\theta \quad (\text{facteur de retard})$$

Les équations (V-14) , (V-15) et (V-16) deviennent :

$$\beta R \frac{\partial C_1}{\partial T} + (1-f')R \frac{\partial C_2}{\partial T} = \frac{1}{P} \frac{\partial^2 C_1}{\partial Z^2} - \frac{\partial C_1}{\partial Z} \quad (V-21)$$

$$(1-\beta)R \frac{\partial C_2}{\partial T} = \omega(C_1 - C_2) \quad (V-22)$$

On dispose de solutions analytiques de ce système d'équations pour les conditions initiales et aux limites correspondantes aux essais décrits. Le paramètre de disparition μ_d est adimensionnalisé selon :

$$\psi = \frac{\mu_d \cdot L \cdot \theta}{v_m \cdot \theta_m} = \frac{\mu_d \cdot L}{v} \quad (V-23)$$

V-5-2 Méthodologie de l'identification des paramètres

On dispose d'un programme d'optimisation du système V-21 et V-22 assorti des conditions initiales et des conditions aux limites suivantes :

- conditions initiales:

$$C_1 = C_2 = 0 \quad T = 0, \forall Z \quad (V-24)$$

- conditions aux limites:

$$-\frac{1}{P} \frac{\partial C_1}{\partial Z} + C_1 = \begin{cases} 1 & Z = 0, \quad 0 \leq T \leq T_1 \\ 0 & Z = 0, \quad T > T_1 \end{cases} \quad (V-25)$$

$$\frac{\partial C_1}{\partial Z} = \frac{\partial C_2}{\partial Z} = 0 \quad Z = \infty \quad \forall T \quad (V-26)$$

Ces conditions mathématiques sont des approximations satisfaisantes pour nos conditions d'essais : qualité des créneaux injectés, longueur de colonne, vitesse d'écoulement (Parker et Van Genuchten 1984a)

A partir d'une courbe de sortie, on optimise au maximum 5 paramètres adimensionnels : P , R , β , ω et Pulse. Le dernier paramètre (Pulse) étant supposé connu, d'après les conditions expérimentales imposées, on dispose en fait de 4 paramètres adimensionnels. Il y a 5 paramètres dimensionnels à chiffrer. Il faut donc travailler en 2 étapes.

Les paramètres hydrodynamiques sont d'abord caractérisés par résolution analytique, les autres paramètres sont ensuite calés par résolution numérique en utilisant les valeurs déterminées précédemment.

a/ Hydrodynamique

L'hydrodynamique est caractérisée avec le traceur et dans ce cas :

$$K = 0, \text{ d'où : } R = 1 \text{ et } \beta = \theta_m / \theta.$$

3 paramètres adimensionnels sont identifiés numériquement :

P , β et ω ($R = 1$ et Pulse connu)

D'où :

$$\alpha = \theta_m \cdot v_m \cdot \omega / L \quad (V-27)$$

$$\theta_m = \beta \cdot \theta \quad (V-28)$$

$$D_m = \frac{v_m \cdot L}{P} = \frac{q}{\theta_m} \frac{L}{P} \quad (V-29)$$

b/ Interactions et consommation

Les interactions sont caractérisées avec le soluté interactif et 4 paramètres adimensionnels sont identifiés : P^* , β^* , ω^* et R^* .

On vérifie que la valeur de ω^* obtenue est la même que celle obtenue précédemment $\omega = \omega^*$.

On peut également ne pas optimiser ω^* et n'identifier que 3 paramètres (gain de temps de calcul).

Les deux points précédents supposent que le coefficient d'échange entre eau mobile et immobile α est le même pour le traceur et le soluté interactif. Si ce n'est pas le cas, α doit être déterminé indépendamment. L'hypothèse de l'identité paraît tout à fait acceptable.

$$K = \theta(R^* - 1) / \rho_d \quad (V-30)$$

$$f' = [\beta^*(\theta + \rho_d K) - \theta_m] / \rho_d K \quad (V-31)$$

La consommation du soluté interactif est décrite par :

$$\mu_d = \frac{\psi \cdot v_m \cdot \theta_m}{L \cdot \theta} = \frac{\psi \cdot v}{L} \quad (V-32)$$

B/ LES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

V-1 Le support expérimental pour les colonnes saturées en eau

V-1-1 Les principaux éléments

Le dispositif final de transfert de solutés a été obtenu après une phase de mise au point effectuée avec le sable de Fontainebleau. Cette phase de mise au point a permis de régler en particulier les problèmes de piégeage des bulles d'air, de contrôle des teneurs en eau (à saturation), de suivi des concentrations et de pH et d'injections des solutés dans les colonnes. Ceci a conduit à la mise au point du dispositif de transfert représenté figure V-5 et dans l'annexe 14a, qui est constitué d'une colonne chromatographique (Pharmacia) de 60 cm de hauteur et 5 cm de diamètre intérieur pour le sable et de 2,6 cm de diamètre et 50 cm de hauteur pour le sol. Les caractéristiques des différentes colonnes de sols utilisées sont présentées annexe 12.

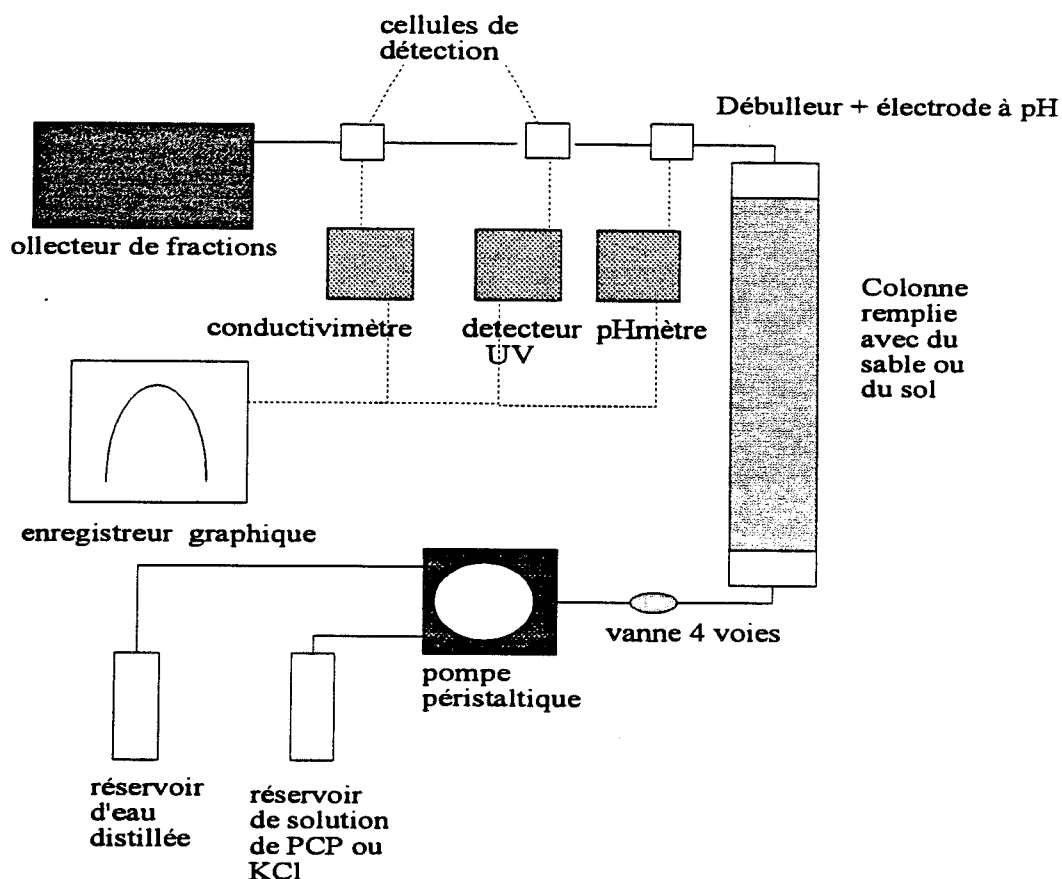


Figure V-5 : Représentation schématique du dispositif de transfert à saturation en eau

Il comprend également une pompe péristaltique (Gilson Minipulse III) qui permet la circulation des solutions : traceur, xénobiotique, phase vecteur (eau déminéralisée ou eau de percolation) à des débits constants et contrôlés (entre 1 et 80 cm³h⁻¹). Une cellule conductivimétrique (Tacussel DEL 1) est associée à un conductivimètre (Tacussel CDRV62) relié à un enregistreur graphique.

De même, le suivi qualitatif des concentrations en PCP a été effectué avec un détecteur U.V. LKB (UVIKORD 4701A) à 254 nm relié à un enregistreur graphique. Ces appareils permettent de détecter qualitativement des variations de concentration dans les courbes de réponses et donc de limiter considérablement le nombre d'analyses chimiques dans les échantillons de solution.

Le suivi du pH s'effectue directement en sortie de colonne en plongeant une sonde pH de taille réduite (Inforlab. DA 14/02-SC) dans une cellule de prélèvement (Pharmacia) dont le volume est de 2 ml. La sonde est reliée à un pHmètre Philips PW9414, lui même relié à un enregistreur graphique.

Un système de débullage est placé entre la sortie de la colonne et les cellules de détection afin de limiter les perturbations dues aux bulles d'air.

En aval des systèmes de détection, un collecteur de fractions (Gilson FC203) recueille les échantillons de solution qui sont analysés par les méthodes décrites précédemment.

V-1-2 Fonctionnement du dispositif

Pour chaque débit dans la colonne étudiée, un régime d'écoulement permanent d'eau est établi en alimentant la colonne par une voie de la pompe péristaltique avec de l'eau ne contenant ni KCl, ni PCP. Cette opération consomme 1 à 2 volumes de pores (volume d'eau contenu dans la colonne). Pendant un temps correspondant à 0,2 ou 1 volume de pore, un créneau de soluté est injecté avec le même débit, suivi d'une alimentation (toujours au même débit) d'eau exempte de soluté. Dans le cas du sol, compte tenu du facteur de retard et des interactions, des créneaux plus longs ont été injectés (environ 10 volumes de pore).

La colonne est pesée systématiquement en début et en fin d'essai pour contrôler la valeur de la teneur en eau moyenne globale et la permanence de celle-ci.

V-2 Le support expérimental pour les colonnes non saturées en eau

V-2-1 Technique de mesure de la teneur en eau

La caractérisation et le contrôle des écoulements d'eau en milieux poreux non-saturés imposent de mesurer les variations spatio-temporelles de la teneur en eau.

Une méthode de mesure, non destructive, consiste à utiliser l'atténuation d'un faisceau de rayons gamma (photons) traversant diamétralement la colonne de sol étudiée. Par un système de détection électronique approprié, on ne comptabilise parmi les photons ayant traversé le milieu étudié, que ceux qui conservent la longueur d'onde de la source.

En optimisant la source radioactive (Am 241), son intensité, la géométrie du faisceau et l'épaisseur de l'échantillon étudié, l'atténuation du rayonnement est donné par :

$$N = N_0 \exp [-(\mu_s \rho_d + \mu_w \rho_w \theta) x - \mu_c \rho_c x'] \quad (V-33)$$

où : N est le taux de comptage des photons ayant traversé l'échantillon sans absorption par le milieu (cps s^{-1})

N_0 est le taux de photons détectés en l'absence d'échantillon (émission de la source dans la géométrie du faisceau) (cps s^{-1})

μ_s , μ_w et μ_c sont les coefficients d'absorption massique du sol, de l'eau et du porte-échantillon ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)

ρ_s , ρ_w et ρ_c sont respectivement la masse volumique sèche du sol, de l'eau et du porte-échantillon (g cm^{-3})

x et x' sont les épaisseurs de l'échantillon et du porte-échantillon vide (cm).

Les essais présentés ici ont été réalisés dans une colonne rigide, et le sol a conservé une masse volumique sèche constante (pas de gonflement ou de retrait).

L'expression précédente se réduit à :

$$N_W = N_S \exp (- \mu_W \rho_W \theta) \quad (V-34)$$

où : N_S est le taux de comptage dans le sol sec

N_W est le taux de comptage dans le sol humide.

Le coefficient d'absorption massique de l'eau μ_W est mesuré indépendamment de la présence de sol. Il est donc possible de déterminer la teneur en eau θ par la mesure de 2 taux de comptage, N_S et N_0 , soit :

$$\theta = \frac{1}{\mu_W \rho_W x} \ln \left[\frac{N_S}{N_0} \right] \quad (V-35)$$

En supposant que l'émission aléatoire de photons par la source suit une loi de Poisson, l'écart type de mesure est donné par :

$$\sigma = \sqrt{N} \quad (V-36)$$

avec N : nombre de photons transmis enregistrés pendant l'intervalle de temps du comptage t (en s).

V-2-2 Fonctionnement du dispositif expérimental

Le dispositif est représenté figure V-6 et dans l'annexe 14b.

La source radioactive émet à travers un collimateur de 5 mm de diamètre, produisant un faisceau cylindrique qui traverse diamétralement la colonne de sol. Le rayonnement non absorbé est également collimaté avant d'être détecté par un scintillateur associé à une électronique de mise en forme des signaux et de comptage.

La source et le détecteur (scintillateur) sont fixés sur une plateforme rigide qui peut se déplacer verticalement. Le déplacement est assuré par un moteur "pas à pas" avec une précision de 100 pas mm^{-1} , et qui peut être commandé manuellement ou par ordinateur. Un programme de pilotage de l'expérimentation a été adapté du travail de Bellini (1992) (annexe 15).

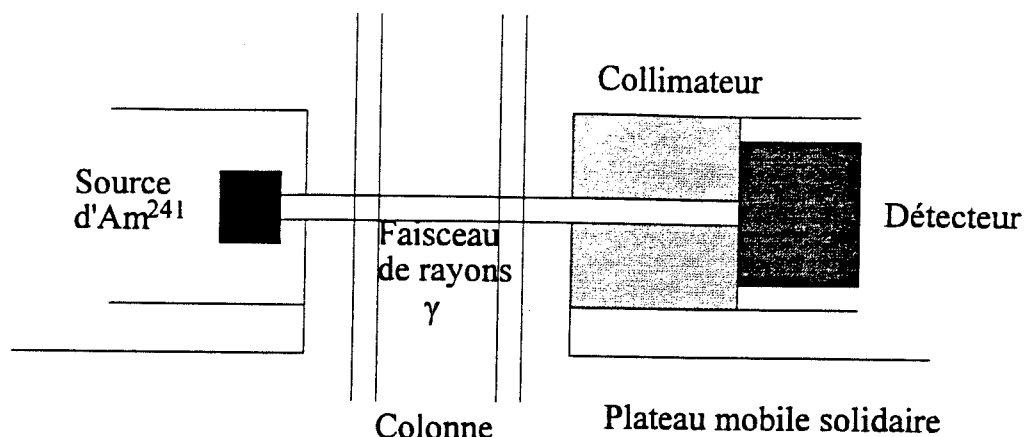


Figure V-6 : Représentation schématique du dispositif de mesure des teneurs en eau

Associé au banc gamma, un porte-échantillon constitué d'une colonne en plexiglas de 36 cm de hauteur, constituée de 5 éléments démontables, permet l'infiltration d'eau et la mise en place de tensiomètres associés à des capteurs de pression (1 par élément).

En imposant un débit constant à l'extrémité supérieure de la colonne et une charge négative à la sortie par l'intermédiaire d'une toile poreuse reliée à un tube capillaire, on peut obtenir différentes teneurs en eau, inférieures à la saturation, pour chaque combinaison de débit et de dépression. La teneur en eau lors de ces essais est contrôlée par des comptages faits à l'aide du banc gamma.

De la même façon qu'en régime saturé, des créneaux de KCl et PCP sont injectés dans la colonne et les échantillons recueillis sont analysés par CLHP ou spectrophotométrie UV.

Le même dispositif de mesures qu'en conditions de saturation en eau est installé avec le système gammamétrique (pHmètre, détecteur U.V., conductivimètre...) (annexe 14c)

V-3 Les caractéristiques des colonnes

Les principales variables utilisées sont définies dans l'annexe 12.

V-3-1 En conditions de saturation en eau

V-3-1-1 Mesure de la densité sèche et de la teneur en eau

Avec les colonnes de sable saturé en eau, le calcul de la densité sèche apparente est effectué simplement par le rapport de la masse de sable introduite et du volume total occupé par le sable. Dans le cas du sol, celui ci étant introduit humide, la mesure de l'humidité préalable est nécessaire pour avoir la masse de sol sec introduit, on calcule ensuite de la même manière la densité sèche apparente.

V-3-1-2 Mesure de la teneur en eau

La mesure de la teneur en eau est effectuée par pesée des colonnes avant et après saturation en eau, ce qui permet d'obtenir la masse totale d'eau ($\rho_w = 1 \text{ g.cm}^{-3}$).

Les écart-types expérimentaux relatifs à ces mesures sont respectivement : $0,02 \text{ g.cm}^{-3}$ pour ρ_d et $0,002 \text{ cm}^3.\text{cm}^{-3}$ pour θ .

V-3-2 En conditions de saturation partielle

L'utilisation du banc gammamétrique permet d'obtenir, en plus des valeurs moyennes de ρ_d et θ , des profils de densité sèche et de teneur en eau grâce à un système d'acquisition de données décrit dans l'annexe 15. Il suffit de caractériser les coefficients d'absorption massique de l'eau (μ_w) et du sable (μ_s).

Le coefficient μ_w est obtenu par un simple étalonnage de $\ln \frac{N_0}{N}$ en fonction de l'épaisseur d'eau traversée pour différents échantillons. Une relation linéaire est ainsi obtenue, dont la pente représente μ_w . La valeur obtenue est de $0,2055 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ pour la première série d'expériences et de $0,1997 \text{ (cm}^2/\text{g)}$ pour la seconde série.

La connaissance de ce coefficient permet de calculer l'épaisseur de l'échantillon tout le long du profil de comptage par la relation :

$$X = \frac{1}{\mu_w \rho_w} \ln \left[\frac{N_{\text{vide}}}{N_{\text{eau}}} \right] \quad (\text{V-37})$$

avec N_{vide} et N_{eau} correspondant aux comptages obtenus avec la colonne vide et pleine d'eau respectivement.

L'écart type expérimental calculé à partir de la relation précédente est de l'ordre de 0,05 cm et l'épaisseur moyenne de la colonne est 5,01 cm.

Le facteur d'adsorption massique du sable sec μ_s est calculé avec la relation :

$$\mu_s = \frac{1}{\rho_d \cdot \bar{X}} \ln \left[\frac{N_{vide}}{N_{sable}} \right] \quad (V-38)$$

avec \bar{X} = épaisseur moyenne de l'échantillon

N_{sable} = comptage sur la colonne pleine de sable

ρ_d = densité sèche moyenne calculée à partir de la masse de sable introduite et du volume occupé par le sable

La valeur de μ_s ainsi obtenue est de $0,255 \pm 0,007 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Cette valeur ainsi que celle de la densité sèche moyenne sont très reproductibles.

Un profil de densité sèche est présenté figure V-7. La teneur en eau est calculée par la relation présentée dans l'annexe 12. Des profils de teneur en eau caractéristiques de ce sable sont présentés figure V-8.

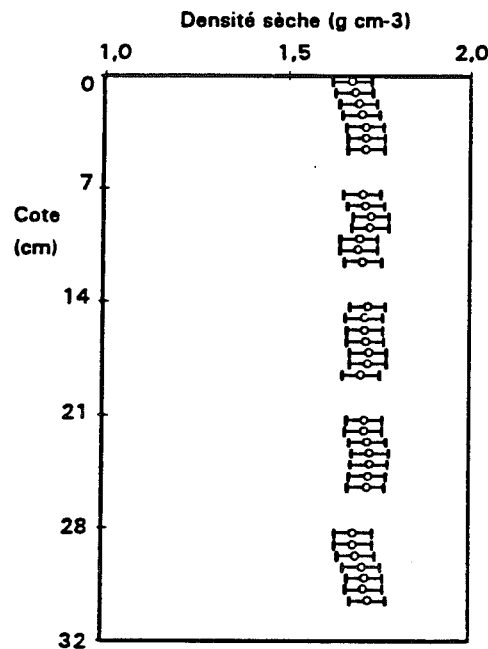


Figure V-7 : Exemple de profil de densité sèche obtenu avec le sable de Fontainebleau (colonne S₃)

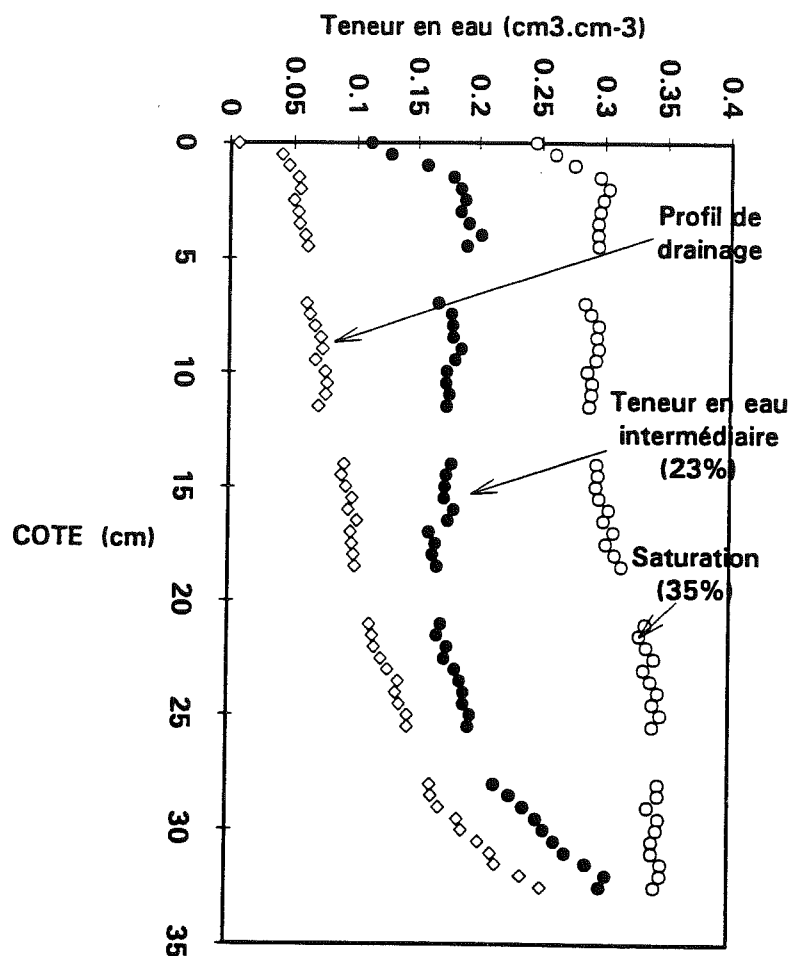


Figure V-8 : Exemple de profils de teneur en eau obtenus dans le sable de Fontainebleau (colonne S₃)

C/ RESULTATS ET DISCUSSIONS

V-1 Transferts à travers la colonne de sable saturée

L'intérêt méthodologique du sable, caractérisé par de faibles interactions avec un soluté, est que ce support permet de résoudre, pour des conditions expérimentales simples, les problèmes technologiques liés aux écoulements : conditions d'entrée "propres", stabilité, piégeage des bulles d'air, collecte d'échantillons de solutions, etc... De plus, il peut donner des indications sur la structure de l'écoulement d'eau (éventuelle immobilisation de l'eau) et sur l'effet induit sur les interactions (effets cinétiques essentiellement).

V-1-1 Analyse des données expérimentales

V-1-1-1 Transfert de KCl

a/ Erreurs de mesure

Le calcul d'erreur n'a pas été effectué sur tous les essais de transfert, nous nous sommes limités à l'étude d'un essai concernant un créneau d'un volume de pore à une vitesse de $0,64 \text{ cm.h}^{-1}$.

Lors des analyses des échantillons, que ce soit pour les chlorures ou pour le PCP, un étalonnage est effectué pour chaque série d'analyses.

Pour analyser les résultats obtenus à partir de ces étalonnages (régressions linéaires), un calcul d'erreur a été effectué en utilisant la méthode décrite par Vauclin et al (1983). Ce calcul est basé sur l'estimation des erreurs commises lors de la recherche de la meilleure estimation de $y = ax + b$, en utilisant la méthode des moindres carrés. Les résultats détaillés sont présentés par Gross (1992) et par Novy Quadri (1993).

En plus des erreurs sur les analyses chimiques (titration au nitrate d'argent et/ou absorption U.V.), nous avons estimé les erreurs induites par les mesures de la teneur en eau (volume de pore) et de la collecte des échantillons (volumes écoulés). Les résultats ainsi obtenus sont représentés figure V-9 sous la forme de courbes de restitution minimale et maximal

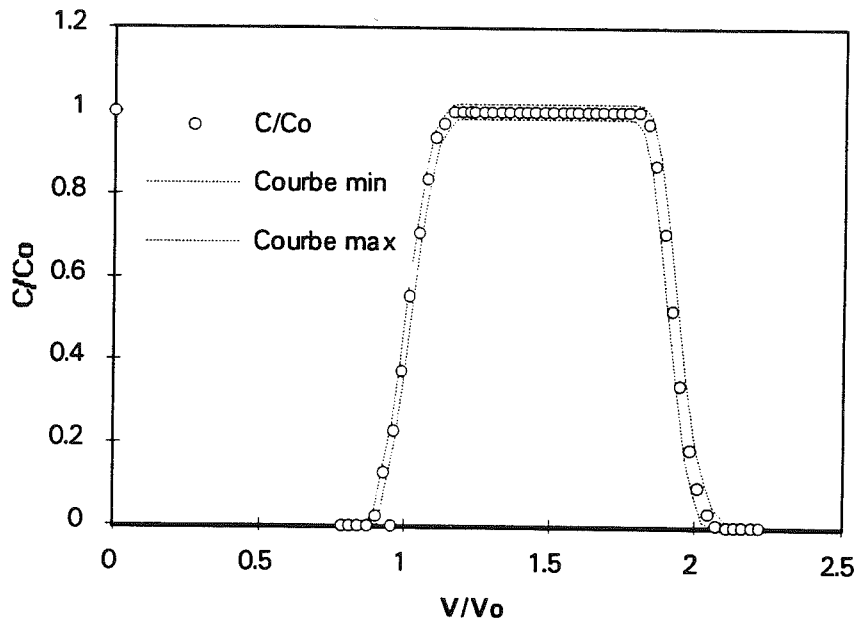


Figure V-9 : Calcul d'erreur sur une courbe de restitution d'un créneau de KCl de 1 volume de pore (colonne S₁)

La figure V-9 montre que les erreurs sur les volumes écoulés sont faibles, les erreurs sur les concentrations étant plus élevées (surtout aux faibles concentrations).

L'erreur cumulée pour le bilan de masse est de $\pm 4\%$ et nous supposons par la suite que les autres essais présentent des erreurs du même ordre de grandeur.

b/ Choix d'une taille de créneau

De nombreux essais de transfert de KCl ont été effectués en utilisant divers débits d'écoulement (entre 4 et 80 ml.h⁻¹) et deux tailles de créneaux de concentrations (0,2 et 1 volume de pore) (figures V-10 et V-11). Dans tous les cas, le taux de récupération (TR) est proche de 100%.

On peut observer sur la figure V-10 l'effet de la vitesse d'écoulement pour une taille de créneau d'environ 0,2 volume de pore.

Il semble qu'avec cette taille de créneau, de faibles différences de durée d'injection ont une influence sur les courbes de réponse, en particulier sur leur hauteur, ce que l'on n'observe pas pour des créneaux plus grands. Des créneaux d'injection de taille plus importante semblent

plus adaptés, car la valeur de concentration relative atteint $C/C_0 = 1$, limitant l'influence de la durée d'injection sur la forme du pic (figure V-11).

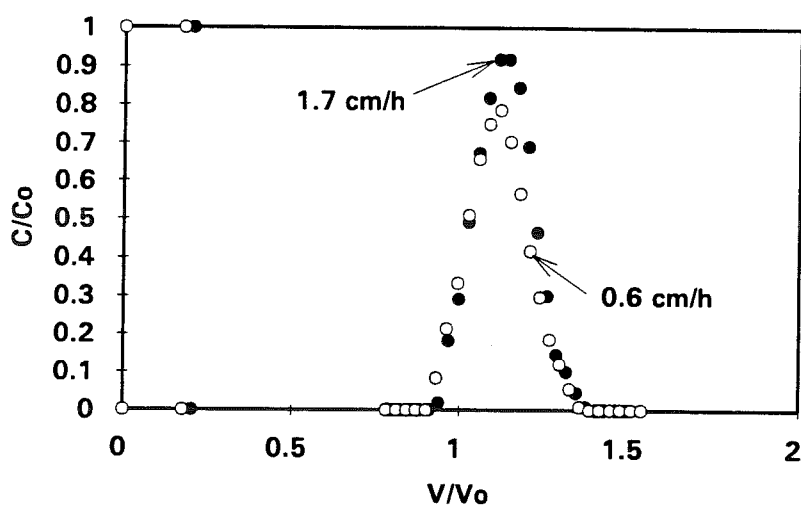


Figure V-10 : Effet de la vitesse d'écoulement sur les courbes de restitution de créniaux de KCl de 0,2 volume de pore (colonne S_2)

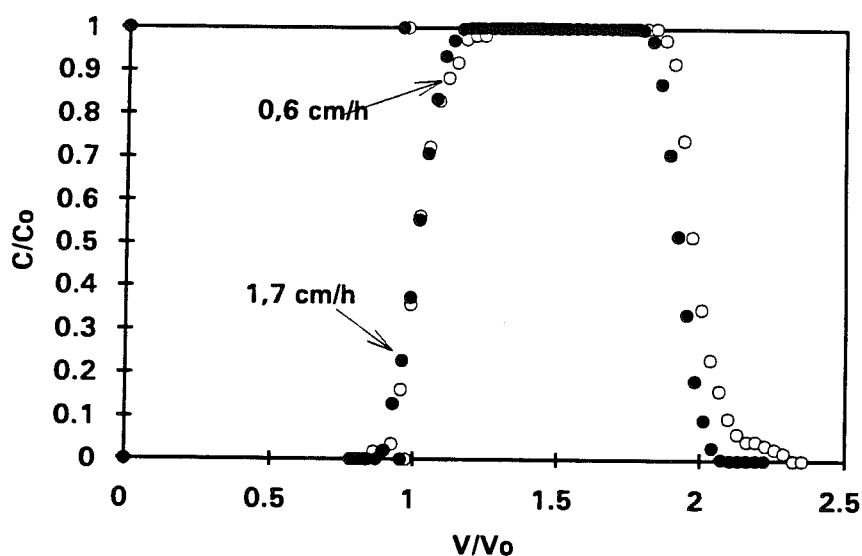


Figure V-11 : Effet de la vitesse d'écoulement sur les courbes de restitution de créniaux de KCl de 1 volume de pore (colonne S_2)

Par ailleurs, les parties montantes et descendantes des courbes obtenues avec ces deux tailles de créniaux sont parfaitement superposables (figure V-12) signifiant ainsi que les renseignements portés par ces deux types de courbes au niveau de l'hydrodynamique sont identiques, avec toutefois moins d'erreurs de mesure pour des créniaux plus longs (concentrations atteintes plus élevées).

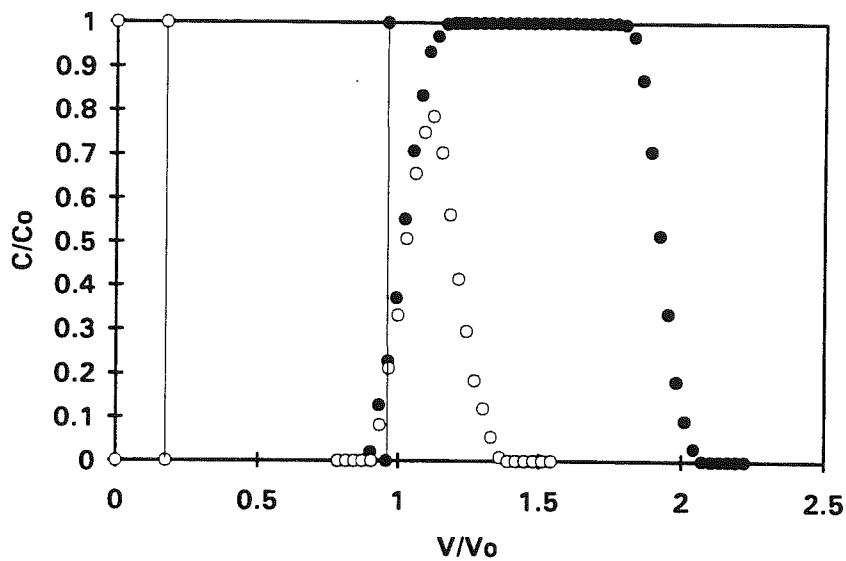


Figure V-12 : Courbes de restitution du traceur avec 2 tailles de créneau différentes (colonne S_2)

Une optimisation de la durée du créneau d'injection peut ainsi être faite : suffisamment longue pour atteindre $C/Co = 1$ mais pas trop longue pour limiter les coûts en frais d'analyse et en temps.

c/ Identification des paramètres

Les colonnes de sable ont été utilisées également pour valider le modèle mathématique disponible au laboratoire (cf. équations V-21 et V-22 pour la forme adimensionnelle et V-12 et V-13 pour la forme dimensionnelle) et pour identifier les paramètres concernant l'hydrodynamique à partir des courbes d'élution obtenues avec le traceur.

L'ajustement des résultats expérimentaux concernant le KCl à des débits d'écoulement de 4 à 40 ml.h^{-1} est présenté figure V-13.

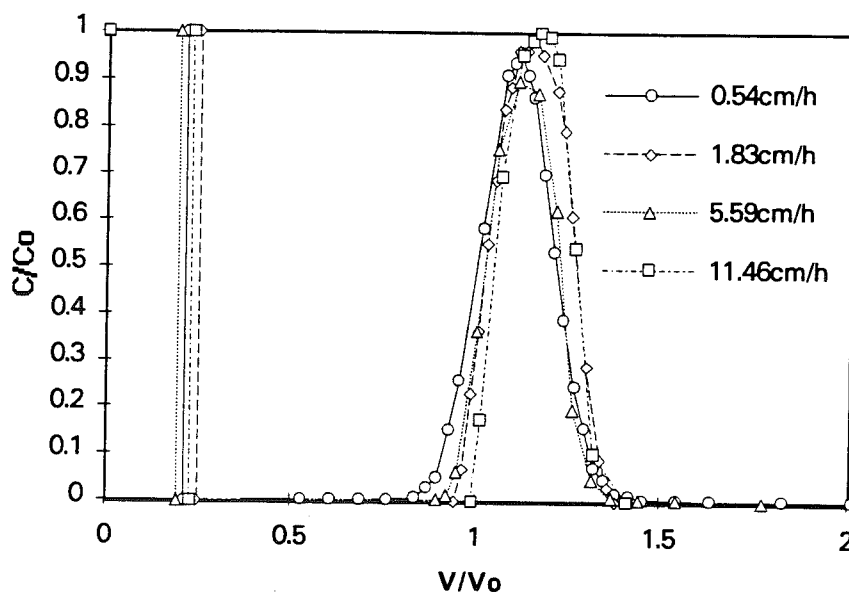


Figure V-13 : Effet de la vitesse d'écoulement sur la courbe de restitution du traceur dans le sable (colonne S_1)

Les résultats de l'optimisation des paramètres sont présentés dans le tableau V-1.

Débit ($\text{cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)	4	12	40	80
$v = q/\theta (\text{cm} \cdot \text{h}^{-1})$	0,54	1,83	5,59	11,45
Pulse	0,213	0,216	0,194	0,228
Péclet	426	647	793	1355
R	1,01	1,03	1,03	1,04
f	0,985	0,985	0,985	0,986
ω	10	20	20	20
D ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)	0,055	0,124	0,310	0,371
K ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,002	0,006	0,006	0,008
$\theta_m (\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3})$	0,345	0,340	0,335	0,358
$\alpha (\text{h}^{-1})$	∞	∞	∞	∞

Tableau V-1 : Ajustement des paramètres hydrodynamiques à partir des courbes d'élution du KCl à différentes vitesses (colonne S_1)

On observe que le facteur de Retard est proche de 1 (dans la fourchette d'erreur), l'ion chlorure se comporte donc comme un traceur de l'écoulement.

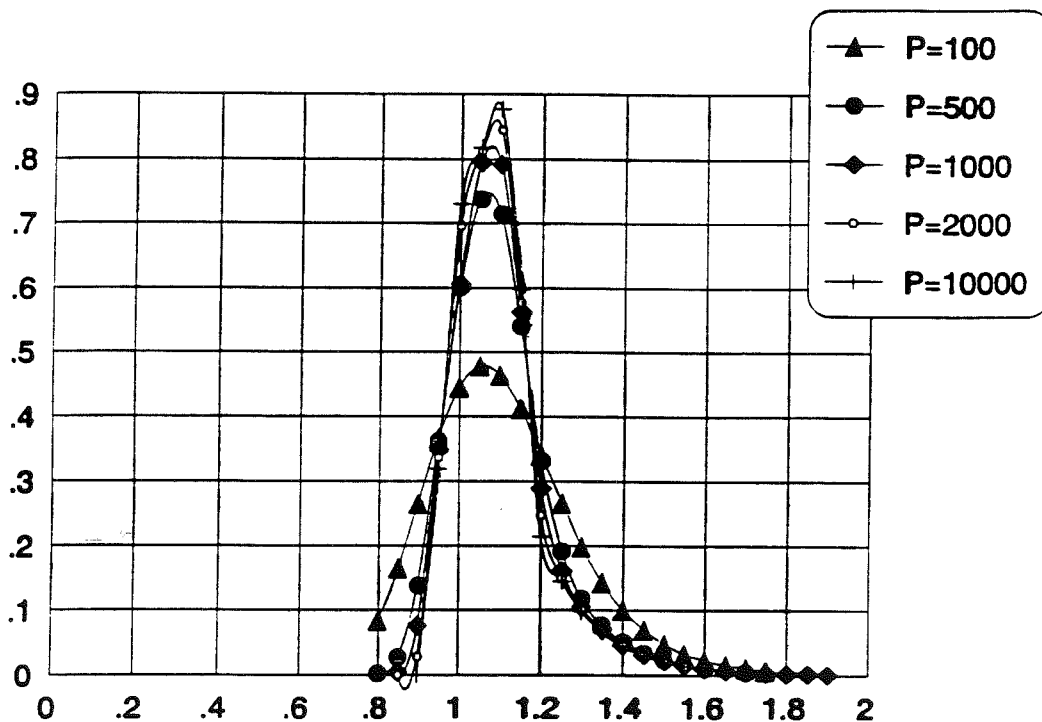
Par ailleurs, il semble que le coefficient de dispersion (D) est très dépendant de la vitesse d'écoulement. Sur ce sable et dans nos conditions, la teneur en eau immobile est très faible : seulement 1,5% de l'eau totale. En ce qui concerne le coefficient de transfert de masse entre les deux fractions d'eau, les valeurs obtenues montrent que l'échange peut être considéré comme instantané.

Suite à ces optimisations, une étude de sensibilité aux paramètres a été effectuée, en variables adimensionnelles.

Les valeurs moyennes autour desquelles sont faits les calculs, sont : $P=1000$, $R=1$, $\beta=0,95$, $\omega=0,5$ et $Pulse = 0,2$.

La sensibilité au nombre de Peclet P , présentée figure V-14, montre que ce paramètre influe sur la largeur du pic, sur sa hauteur maximale, mais influe peu sur la traînée au-delà de $1,5 V/V_0$. C'est un paramètre peu sensible dès que $P \geq 500$.

C/C_0

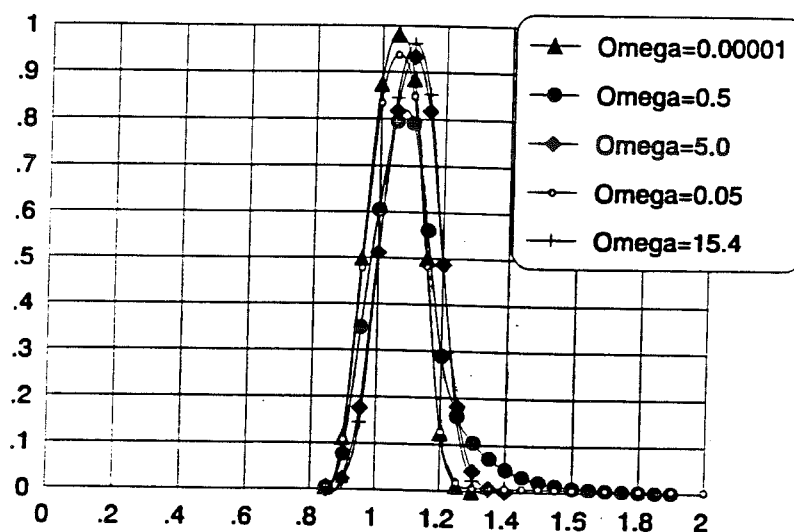


$T = V/V_0$

Figure V-14 : Sensibilité du modèle au paramètre Péclet

Le paramètre ω , lié au coefficient d'échange entre eau mobile et eau immobile règle essentiellement la forme de la traînée (figure V-15), avec un maximum de traînée pour $\omega = 0,5$.

C/C_0

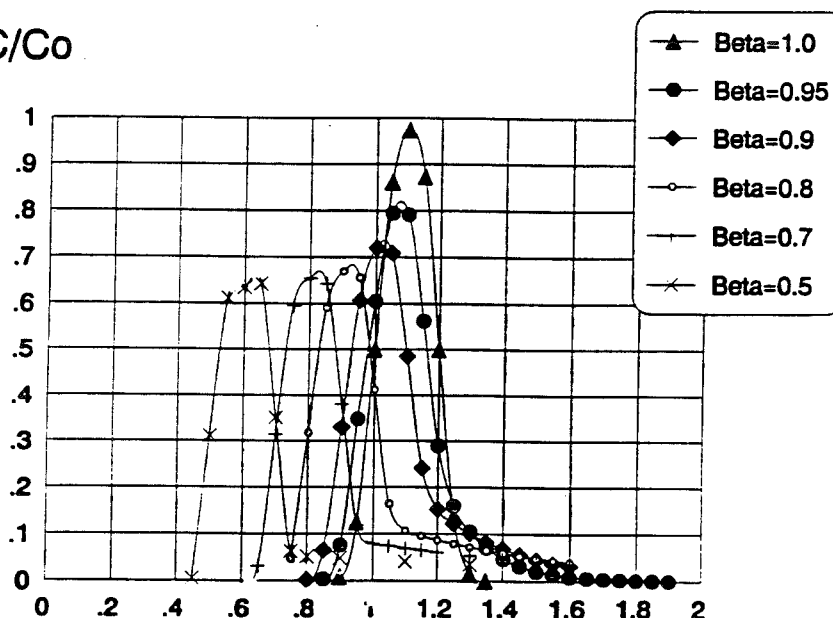


$T = V/V_0$

Figure V-15 : Sensibilité du modèle au paramètre ω

Le paramètre β , significatif de la fraction mobile, agit sur le temps de passage du pic et sur la hauteur de l'asymptote de la traînée (figure V-16).

C/C_0



$T = V/V_0$

Figure V-16 : Sensibilité du modèle au paramètre β

Enfin, le facteur de retard R , retarde le temps d'apparition du pic (figure V-17).

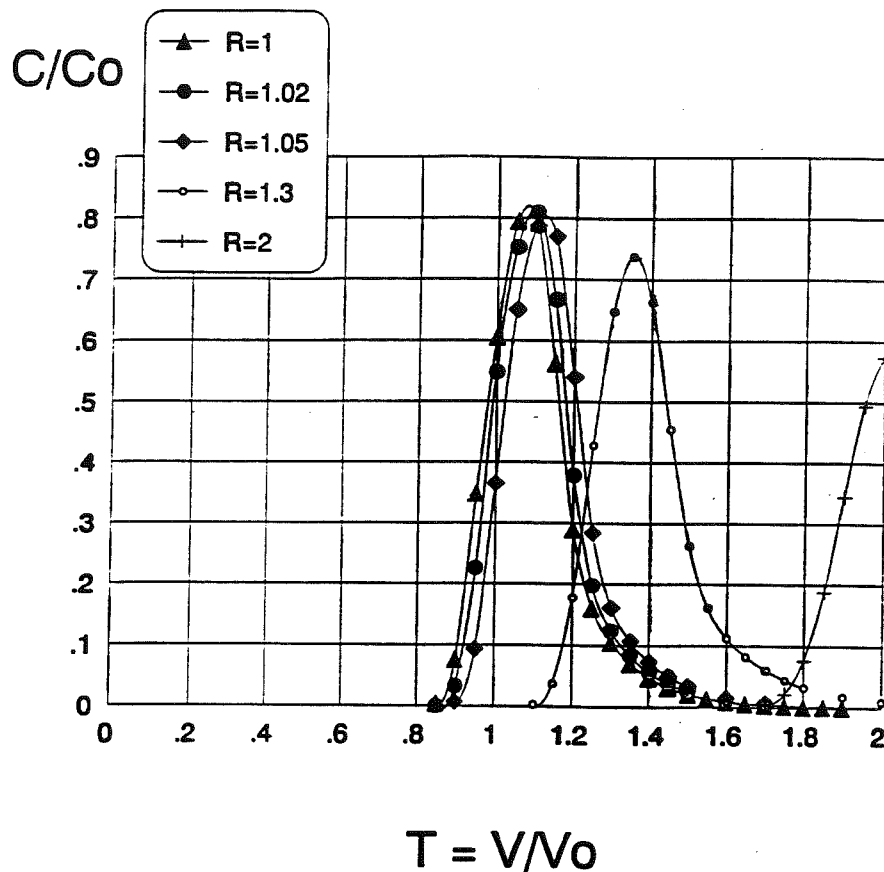


Figure V-17 : Sensibilité du modèle au paramètre R

d/ Effet de la désaturation

En suivant le protocole expérimental décrit précédemment, nous avons pu obtenir des profils de teneur en eau moyens, différents de la saturation : 23% et 28% (la saturation étant à 36%). Des essais de transfert ont été effectués à 23% de teneur en eau, avec du KCl.

Les résultats obtenus dans ces conditions sont présentés figure V-18 et comparés ceux obtenus dans le sable saturé à une même vitesse de Darcy ($q = 4 \text{ cm.h}^{-1}$).

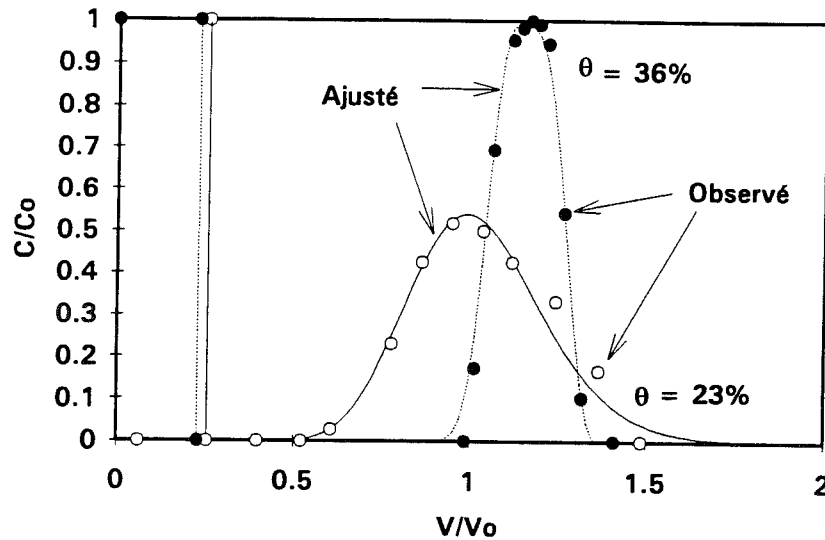


Figure V-18 : Effet de la désaturation sur la courbe d'élution du traceur de l'écoulement dans le sable (colonne S₃)

Les résultats concernant l'ajustement des paramètres pour ces deux courbes sont présentés dans le tableau V-2.

On peut observer sur cette figure trois effets principaux de la désaturation sur le transfert de KCl :

- Une sortie précoce du soluté de la colonne de sable, implique que toute l'eau ne participe pas à l'écoulement, ce qui se traduit par une diminution du paramètre β qui passe de 0,986 à 0,9 indiquant une augmentation de la teneur en eau immobile.

- Contrairement aux essais en conditions de saturation où les fronts des courbes sont raides (compressifs), on observe un front très dispersif, caractérisé par une augmentation de la largeur du pic pour un créneau d'injection identique. Ceci se traduit par une diminution du paramètre Péclet, (et donc une augmentation du coefficient de dispersion du milieu).

- La désaturation provoque l'apparition d'une trainée en fin de pic correspondante à une restitution lente du soluté. Ceci confirme la présence d'eau immobile et l'existence d'un échange eau mobile-eau immobile, mise en évidence par la diminution de la valeur du paramètre ω .

	Saturation (S1)	Saturation partielle (S3)
Débit (ml.h ⁻¹)	81,6	80,6
$v = q/\theta$ (cm.h ⁻¹)	11,46	18,32
Pulse	0,238	0,255
Peclet	1355	50
R	1,04	1,0
β	0,986	0,9
ω	20	1. 10 ⁻⁶
D (cm ² .h ⁻¹)	0,371	13,2
K (cm ³ .g ⁻¹)	0,008	0
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,358	0,179
α (h ⁻¹)	∞	1,1. 10 ⁻⁷

Tableau V-2 : Comparaison des paramètres hydrodynamiques relatifs au traceur et ajustés dans une colonne de sable saturée et non saturée en eau (colonnes S1et S3)

V-1-1-2 Discussion

Les résultats concernant le transfert de KCl dans la colonne de sable ont permis de caractériser les paramètres hydrodynamiques en conditions de saturation en eau totale ou partielle.

A saturation, quelle que soit la largeur du créneau d'injection, la vitesse d'écoulement a peu d'influence sur la forme de la courbe, les variations observées sont de l'ordre de grandeur des erreurs de mesure. L'optimisation des paramètres a confirmé que l'ion chlorure peut être considéré comme un traceur de l'écoulement, le facteur de retard R étant égal à 1 (à 4% près).

D'autre part, la teneur en eau immobile semble très faible en conditions de saturation en eau, la teneur en eau mobile est donc quasiment égale à la teneur en eau totale ($\theta_m \cong \theta$).

Pour des débits d'eau susceptibles d'être rencontrés dans les sols, seul le coefficient de dispersion varie avec la vitesse d'écoulement, ce qui a déjà été largement observé par ailleurs (Gaudet 1978, Novy Quadri 1993).

Le paramètre hydrodynamique important, à saturation, est donc le coefficient de dispersion qui dépend non seulement de la vitesse d'écoulement mais aussi de la structure et de la texture du sol (Musy & Soutter 1991, Pfannkuch 1962).

En condition de saturation partielle, la courbe de restitution du KCl très différente des courbes précédentes met en évidence l'effet important de la phase gazeuse sur les caractéristiques hydrodynamiques des sols (Gaudet 1978, Mermoud 1982).

Le fait qu'environ 1/3 de la porosité soit occupé par une phase gazeuse a entraîné l'augmentation de la teneur en eau immobile à 22% de la teneur en eau totale contre 1,4% en conditions de saturation.

Par ailleurs, la désaturation en eau a conféré à l'écoulement dans la colonne de sable un effet dispersif beaucoup plus important que celui de la colonne saturée, provoquant une augmentation d'un facteur 35 du coefficient de dispersion D (de 0,371 à 13,2 cm².h⁻¹).

La trainée correspondante au transfert du soluté entre les deux fractions d'eau est prise en compte par le paramètre ω qui conduit à une valeur du paramètre α de $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est faible, comparée à celle trouvée par Gaudet (1978) qui a identifié une valeur de $\alpha = 0,085 \text{ h}^{-1}$ pour un sable à des teneurs en eau proches des nôtres. Les deux sables, de nature et de texture très différentes conduisent probablement à une mise en contact très différente des fractions d'eau mobile et immobile.

D'autre part, les distributions de teneur volumique en eau obtenues par Gaudet (1978) sont plus homogènes que celles relatives à ce travail (figure V-8). La distribution de la phase liquide dans la porosité est donc différente entre les deux sables, induisant des valeurs des coefficients de transferts différentes.

V-1-2 Transfert de PCP

V-1-2-1 Erreurs de mesures et choix d'une taille de créneau

Comme pour le KCl, la précision des dosages de PCP et des différentes grandeurs utilisées pour l'obtention des courbes d'élution (volumes écoulés, teneur en eau), a été analysée.

Nous avons ainsi pu encadrer les résultats expérimentaux par des courbes minimale et maximale pour des créneaux de 0,3 et 1 volume de pore (figures V-19 et V-20) à une vitesse de $0,63 \text{ cm.h}^{-1}$ avec une concentration d'injection de 10 mg.l^{-1} .

On observe sur ces figures que la précision sur la concentration est bien inférieure à celle obtenue avec le KCl.

La taille du créneau influe sur la précision du bilan de masse puisqu'on obtient une variation de $\pm 18\%$ pour le créneau de 0,3 volume de pore contre $\pm 11\%$ pour le créneau de 1 volume de pore. Ce résultat provient du fait que le taux de récupération est calculé à partir d'une plus grande masse injectée et que les erreurs aux fortes concentrations sont plus faibles.

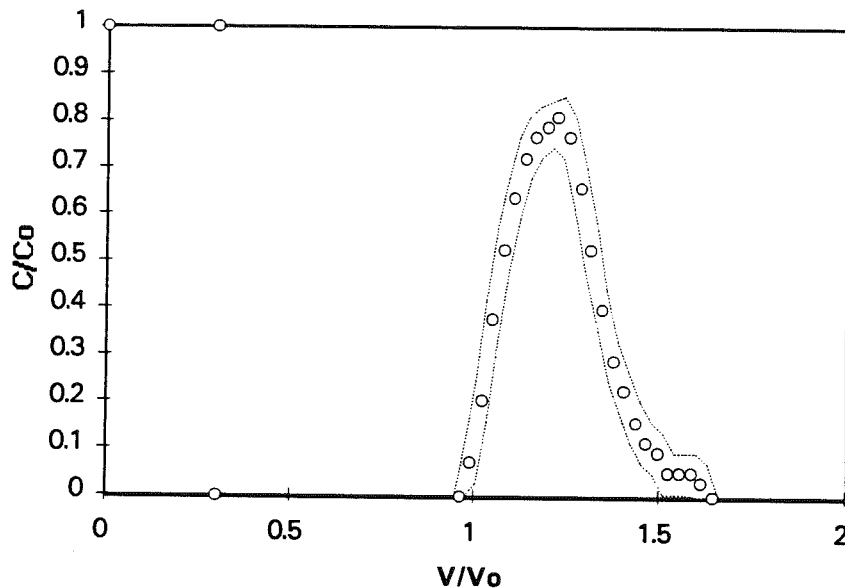


Figure V-19 : Calcul d'erreur sur un créneau de PCP de 0,2 V/V_0 (colonne S_1)

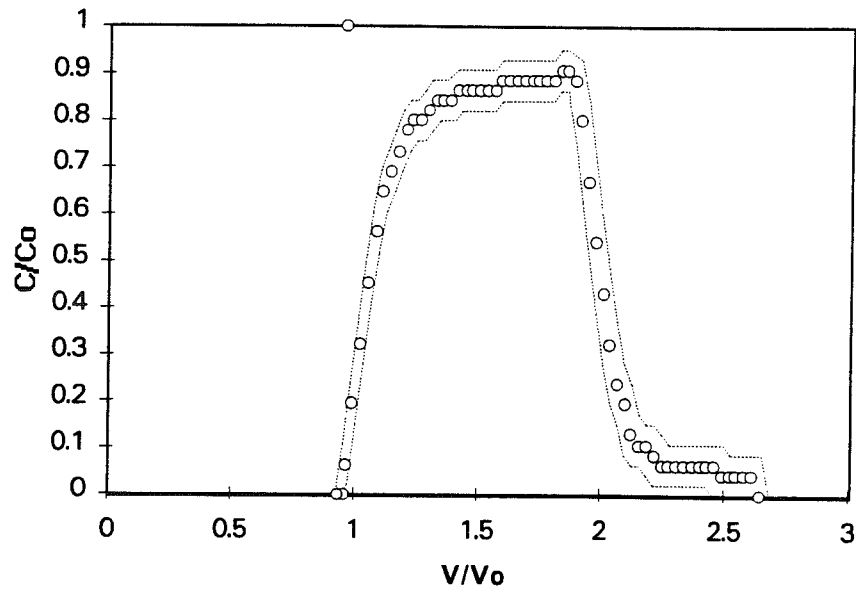


Figure V-20 : Calcul d'erreur sur un créneau de PCP de 0,96 V/V_0 (colonne S_1)

Comme pour le KCl, les courbes sont plus facilement exploitables en utilisant les créneaux les plus larges.

De plus, les deux types de créneaux produisent des courbes de restitution avec des fronts montants superposables (figure V-21)

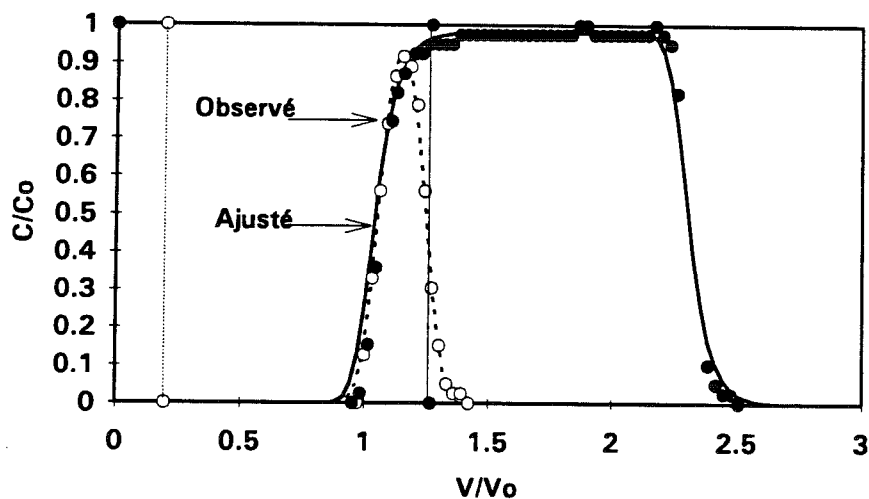


Figure V-21 : Effet de la taille du créneau sur la courbe de restitution du PCP (colonne S_2)

Les paramètres ajustés sont proches (tableau V-3) :

	Créneau large	Petit créneau
$Q(\text{ml.h}^{-1})$	4	4
$v(\text{cm.h}^{-1})$	1,95	1,91
Pulse	1,27	0,19
Peclet	806	804
R	1,05	1,05
β	0,96	0,982
ω	1	20
$D(\text{cm}^2.\text{h}^{-1})$	0,077	0,076
$K(\text{cm}^3.\text{g}^{-1})$	0,009	0,009
$\theta_m(\text{cm}^3.\text{cm}^{-3})$	0,298	0,298
$\alpha(\text{h}^{-1})$	0.018	∞

Tableau V-3 : Ajustement des paramètres pour les courbes de restitution du PCP avec deux créneaux d'injection différents (colonne S₂)

La valeur du paramètre ω obtenue pour le petit créneau implique que l'échange entre l'eau mobile et l'eau immobile n'est pas significatif. Ceci est dû essentiellement aux imprécisions plus élevées de la courbe correspondant au petit créneau, qui influencent surtout la hauteur de la courbe.

b/ Effet de la vitesse d'écoulement

De nombreux essais de transfert de PCP ont été effectués sur plusieurs séries de colonnes de sable saturé aux vitesses d'écoulement imposées aux solutions de KCl et avec deux tailles de créneaux d'injection.

Contrairement au traceur de l'écoulement, nous avons observé avec le PCP une variabilité des courbes de restitution (pour des conditions expérimentales semblables) qui semble due aux propriétés physico-chimiques de la molécule et à l'écoulement. Nous avons éliminé les comportements qui sont de même ordre de grandeur que les erreurs de mesure.

Nous avons représenté figures V-22 et V-23 plusieurs essais de transfert de PCP à des débits de 4 et 40 ml.h⁻¹. Les différences se situent essentiellement sur la hauteur des pics et sur les taux de récupération qui

passent d'environ 87% en moyenne pour le débit le plus élevé à une moyenne de 48% pour le débit plus faible.

L'effet de vitesse est représenté figure V-24 où l'on peut observer plusieurs points :

- La position du début des courbes de restitution est constante et légèrement décalée par rapport au point de coordonnées (1;0,5) caractéristique d'un traceur. Ceci est significatif de faibles interactions réversibles qui n'ont pas été détectées en batch (à la précision des mesures près).

- Le taux de récupération diminue avec la vitesse d'écoulement mettant ainsi en évidence l'existence d'interactions "irréversibles" dépendantes de la vitesse d'écoulement.

- Une trainée apparaît en fin de courbe de restitution significative d'une restitution lente du soluté vers l'eau mobile.

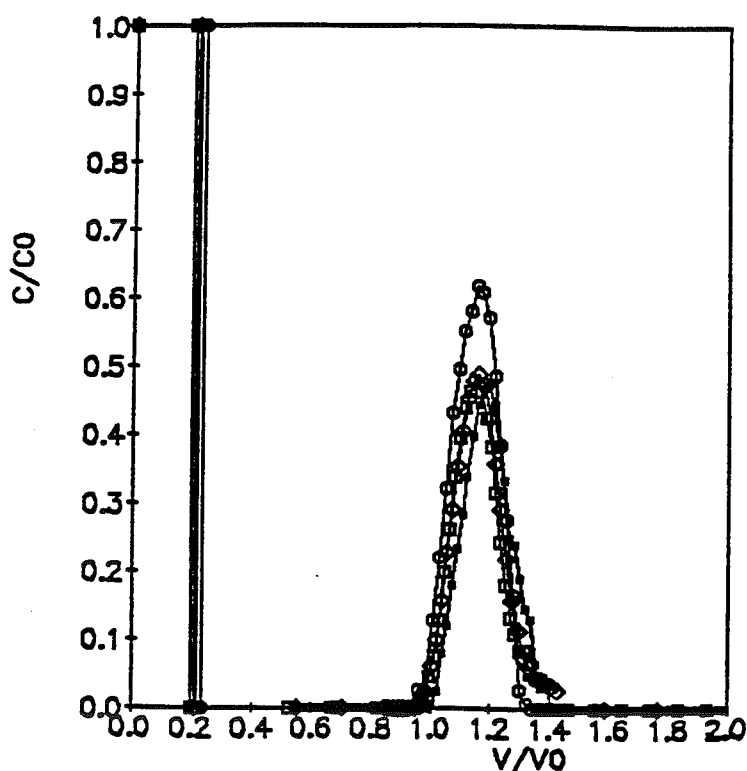


Figure V-22 : Courbes de restitution de PCP à 10 mg.l^{-1} dans le sable à une vitesse de $0,6 \text{ cm.h}^{-1}$ (colonne S_1)

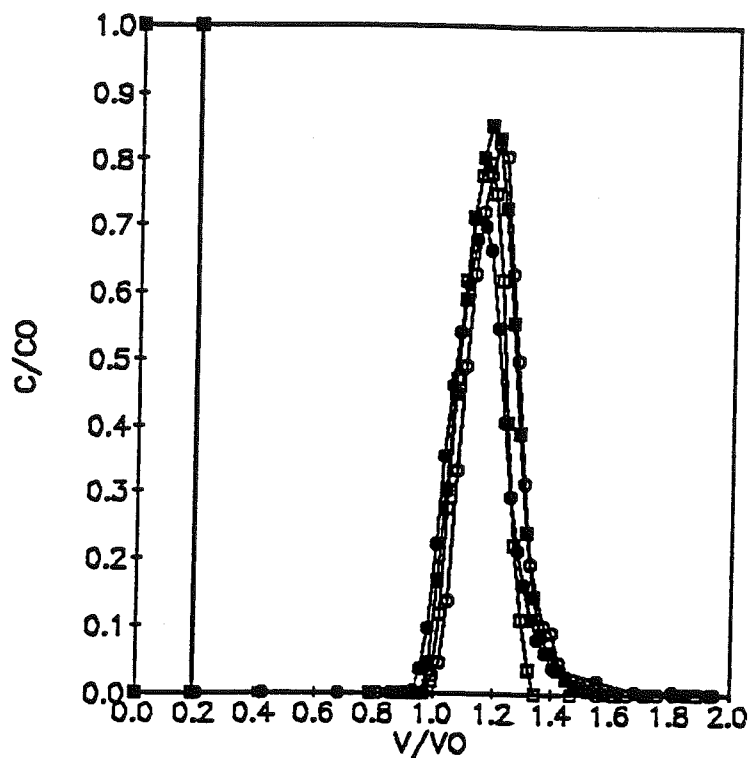


Figure V-23 : Courbes de restitution de PCP à 10 mg.l^{-1} dans le sable à une vitesse de $5,6 \text{ cm.h}^{-1}$ (colonne S_1)

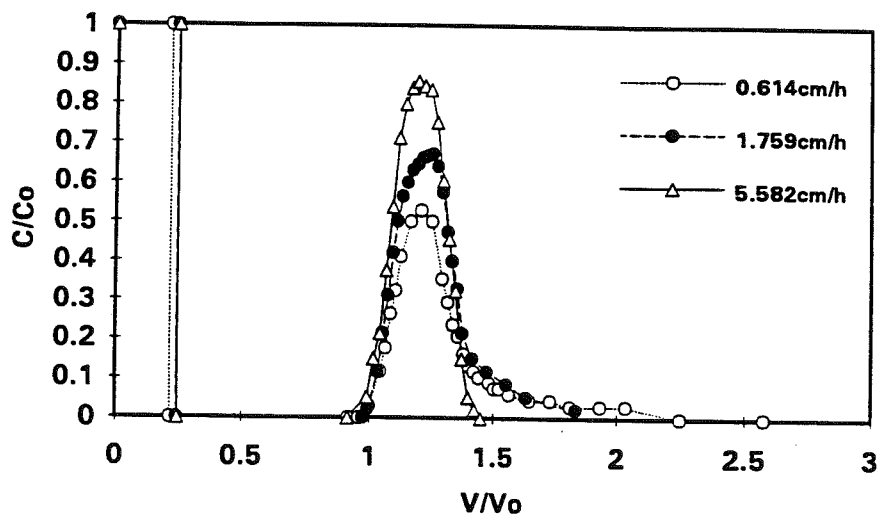


Figure V-24 : Effet de la vitesse d'écoulement sur la courbe de restitution du PCP dans le sable (colonne S_1)

Le taux de restitution du PCP étant différent de 100%, l'ajustement des paramètres correspondant à ces courbes d'élution a été effectué en utilisant la résolution numérique décrite par Novy Quadri (1993). Les résultats sont présentés dans le tableau V-4.

Débit(ml.h ⁻¹)	4	12	40
v(cm.h ⁻¹)	0,61	1,76	5,58
Pulse	0,214	0,243	0,214
Péclet	400	800	994
R	1,25	1,18	1,085
β	0,87	0,9	0,986
ω	0,5	0,5	0,5
Ψ	0,425	0,125	0,024
D(cm ² .h ⁻¹)	0,067	0,097	0,246
K(cm ³ .g ⁻¹)	0,051	0,037	0,018
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,348	0,356	0,357
α (h ⁻¹)	0,0025	0,007	0,023
μ_d (h ⁻¹)	0,006	0,005	0,003

Tableau V-4 : Ajustement des paramètres sur les courbes de restitution du PCP à 3 vitesses d'écoulement différentes (colonne S₁)

Comme pour le KCl, on constate que l'augmentation de la vitesse d'écoulement entraîne surtout une variation du coefficient de dispersion D. Les autres paramètres (R et β) varient dans une gamme de valeurs plus étroite, mais tout de même significative. Il semble donc que la vitesse d'écoulement ait un effet sur les interactions du PCP avec la matrice et sur le fractionnement de l'eau, bien que ce dernier point n'ait pas été observé avec le traceur. Les courbes relatives à des taux de récupération inférieurs à un sont correctement représentées par le modèle incluant le paramètre μ_d .

c/ Effet de la concentration en PCP

Des créneaux contenant des concentrations en PCP de 50 et 100 mg.l⁻¹ ont été injectés dans la colonne de sable saturée et comparés à un créneau de même taille obtenu à 10 mg.l⁻¹ (figure V-25).

Les résultats obtenus en variables adimensionnelles montrent que les courbes d'élution de PCP à 3 concentrations ne sont pas significativement différentes compte tenu de la précision des mesures. Dans les trois cas, le

taux de récupération est proche de 100% (tableau V-5). Les paramètres ajustés sur ces courbes, ne varient pas de manière significative.

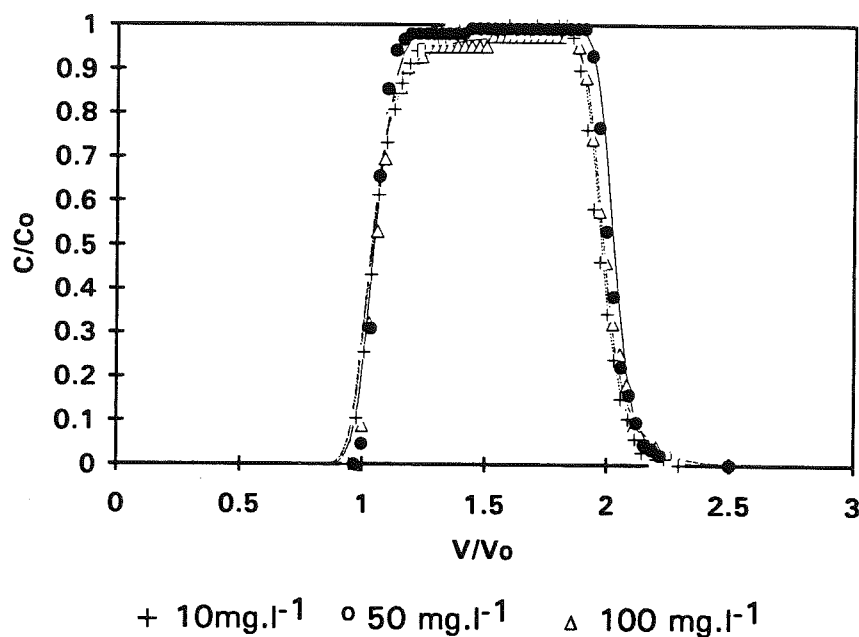


Figure V-25 : Effet de la concentration en PCP sur la courbe de restitution (colonne S₂)

PCP (mg.l ⁻¹)	10	50	100
Péclet	795	801	807
R	1,05	1,04	1,04
β	0,96	0,96	0,97
ω	0,5	0,7	1
Ψ	0,092	0,086	0,008
D (cm ² .h ⁻¹)	0,07	0,074	0,077
K (cm ³ .g ⁻¹)	0,008	0,008	0,008
θ _m (cm ³ .cm ⁻³)	0,292	0,293	0,293
α (h ⁻¹)	0,008	0,012	0,018
μ _d (h ⁻¹)	0,005	0,005	0,0005

Tableau V-5 : Ajustement des paramètres correspondant aux courbes d'éluion du PCP à différentes concentrations (colonne S₂)

d/ Effet du pH

Le PCP est une molécule ionisable, et les résultats du chapitre II ont montré que son comportement est très dépendant du pH. Il nous a paru intéressant d'effectuer des essais de transfert de PCP à différentes valeurs de pH.

Tous les essais précédents ont été effectués à un pH correspondant à celui de l'eau pure équilibrée avec l'atmosphère, soit pH # 6.

Nous avons effectué deux essais de transfert de PCP à pH 8 et à pH 4. A pH 4, nous n'avons pas observé de sortie du PCP de la colonne de sable, alors qu'à pH 8 nous observons un taux de restitution supérieur à 100% (figure V-26). Le niveau du taux de récupération du soluté ainsi que la trainée observée en fin de créneau semblent indiquer que du PCP initialement retenu est extrait de la colonne de sable à cause du pH élevé.

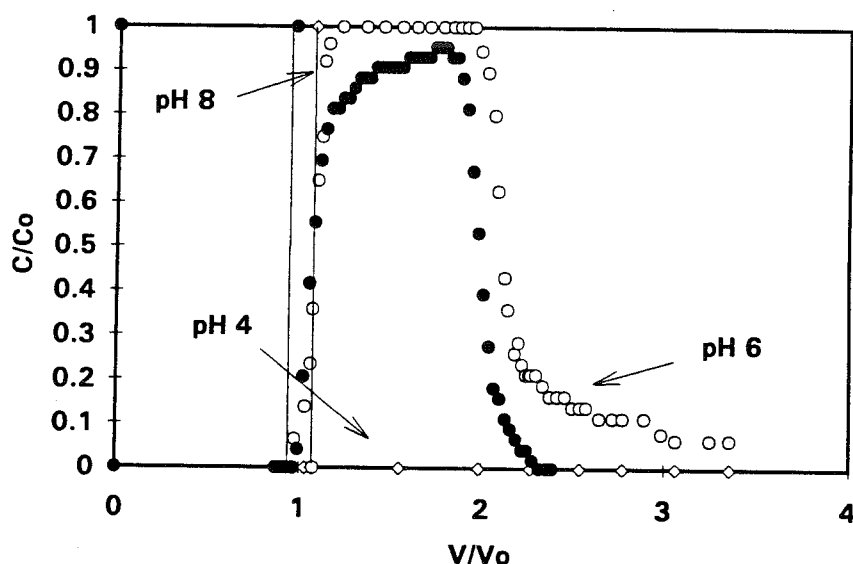


Figure V-26 : Effet du pH sur la courbe de restitution du PCP dans la colonne de sable saturé pour une même vitesse (colonne S2).

Il semble donc, au vu de ces résultats, que le pH joue un rôle prépondérant sur le comportement du PCP en colonne de sable puisque tout le PCP injecté peut être retenu par la matrice solide, bien que celle-ci ne présente apparemment aucun site de fixation clairement démontré si l'on se réfère aux résultats obtenus en batch.

Le pH ayant un effet sur le produit de solubilité du PCP, on peut donc supposer que son effet dans la colonne sera de provoquer la précipitation du soluté.

Le pK_A du PCP est assez proche du pH auquel ont été effectués les essais précédents. Une variation locale faible de pH peut entraîner un déséquilibre entre le nombre de molécules ionisées et celui des molécules neutres qui peuvent alors précipiter au contact de sites localement plus acides, entraînant ainsi un effet "boule de neige", en augmentant l'acidité de l'environnement de ces sites spécifiques.

Nous avons effectué avant l'étude sur le pH un transfert d'une solution de KOH à pH 10 à travers la colonne de sable, afin de vérifier si le PCP qui avait disparu au cours des différents essais précédents (où le taux de récupération était différent de 1), peut être élué après redissolution ou désorption.

Le résultat obtenu est présenté figure V-27, où l'on peut voir qu'effectivement, une quantité non négligeable de PCP est réactivée lors du passage du pulse de KOH, confirmant ainsi l'importance du pH sur le comportement du PCP. Ce résultat a été confirmé lors de l'essai à pH 8 (figure V-26) avec l'apparition d'une trainée importante et à un taux de récupération supérieur à 100%.

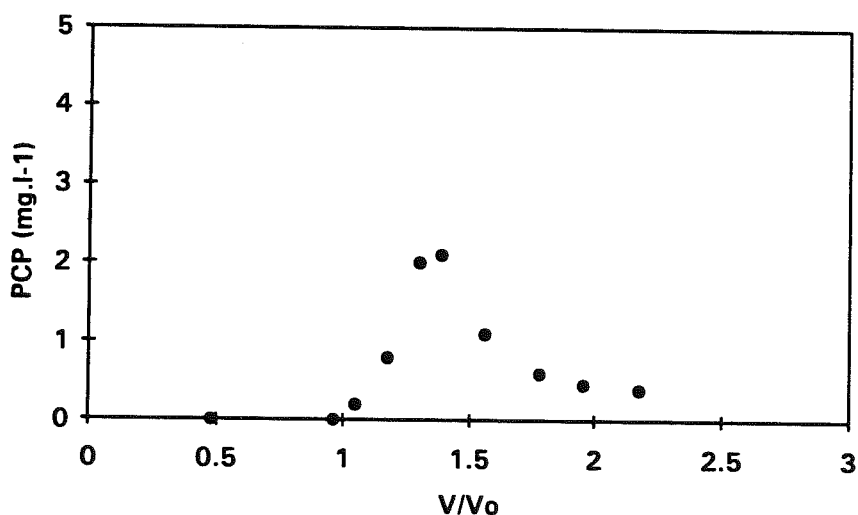


Figure V-27 : Récupération du PCP retenu dans la colonne de sable par injection d'un créneau de KOH M/100 (colonne S₁)

e/ Effet de la désaturation

Des transferts de créneaux de PCP en conditions de saturation partielle en eau ont été effectués dans les mêmes conditions que le traceur d'écoulement (KCl). Les résultats obtenus sont très reproductibles si l'on tient compte des variations de distribution de l'eau dans la colonne. Les variations des profils de teneur en eau ont provoqué, comme l'a souligné Novy Quadri (1993) une variation spatiale de la fraction mobile qui peut influencer la cinétique d'échange (Gaudet 1978).

Les courbes d'élution du PCP obtenues à saturation (36%) et à des teneurs en eau de 28% et 23% sont présentées figure V-28 .

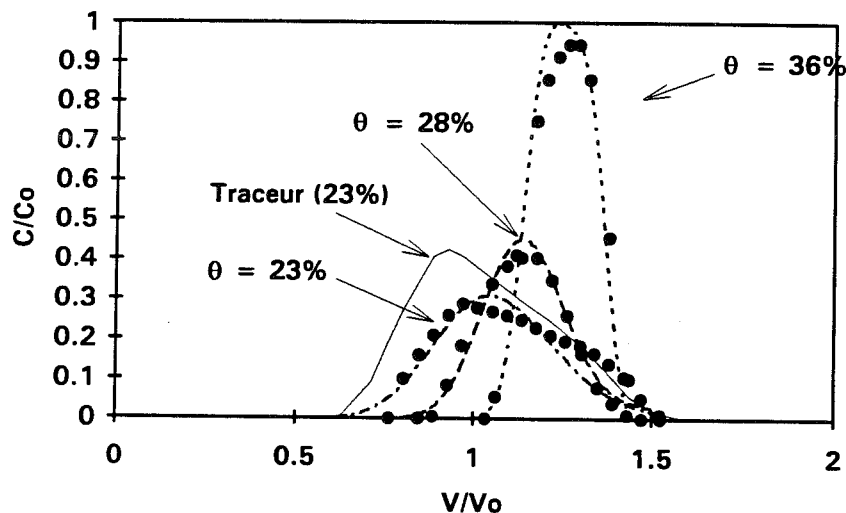


Figure V-28 : Effet de la désaturation sur la courbe d'élution du PCP à 10 mg.l^{-1} dans le sable (colonne S₃)

Comme pour le KCl, on peut observer, en variables adimensionnelles, une sortie de plus en plus rapide au fur et à mesure que l'on désature le sable, liée à une augmentation de la teneur en eau immobile.

Par ailleurs, on peut observer un étalement de plus en plus grand de la courbe de restitution, ce qui signifie que le milieu est de plus en plus dispersif.

On observe également l'apparition d'une dissymétrie de la courbe qui se traduit par une trainée de plus en plus prononcée caractéristique d'un échange important entre les deux fractions d'eau.

Ces observations visuelles sont confirmées par les paramètres ajustés sur les courbes (Tableau V-6) où l'on observe en particulier que le coefficient de dispersion augmente avec la désaturation, et que θ_m/θ diminue.

θ (cm ³ .cm ⁻³)	0,36	0,28	0,23
v (cm.h ⁻¹)	11,3	24,0	18,0
Taux de restitution (%)	100	75	70
Pulse	0,225	0,167	0,207
Péclet	1355	200	70
R	1,05	1,05	1,15
β	0,986	0,95	0,85
ω	20	0,3	0,1
Ψ	0	0,2	0,4
D (cm ² .h ⁻¹)	0,36	4,3	9,25
K (cm ³ .g ⁻¹)	0,01	0,008	0,02
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,357	0,266	0,196
f'	0,87	0,95	0,84
α	1,85	0,056	0,0115
μd (h ⁻¹)	0	0,133	0,20

Tableau V-6 : Ajustement des paramètres sur les courbes de restitution du PCP à différentes teneurs en eau (colonne S₃)

Parallèlement aux effets dûs à l'hydrodynamique, on observe également des interactions réversibles et irréversibles qui se traduisent par un taux de récupération (TR) qui diminue avec la teneur en eau et par un décalage par rapport à la courbe de restitution du traceur.

Par ailleurs, on observe que le coefficient d'échange α diminue jusqu'à 0,0115 h⁻¹, valeur proche de celle déterminée à saturation avec un créneau large (tableau V-3).

V-1-2-2 Discussion

Les résultats présentés nous ont permis de cerner certains facteurs influant sur le comportement du PCP en colonnes de sable.

En nous basant sur les courbes d'erreurs décrites précédemment, nous pouvons dire, en ce qui concerne le choix de la taille de créneau, que des créneaux de trop petite taille sont moins précis et porteurs d'informations que des créneaux plus larges.

Par ailleurs, nous avons pu observer qu'à saturation, le PCP se comporte quasiment comme un traceur de l'écoulement avec, cependant, de faibles interactions réversibles qui entraînent un léger retard du PCP par rapport au traceur.

Ce résultat est en accord avec celui observé par Goerlitz et al (1985) qui observent un retard similaire du PCP dans un sédiment saturé (figure V-29).

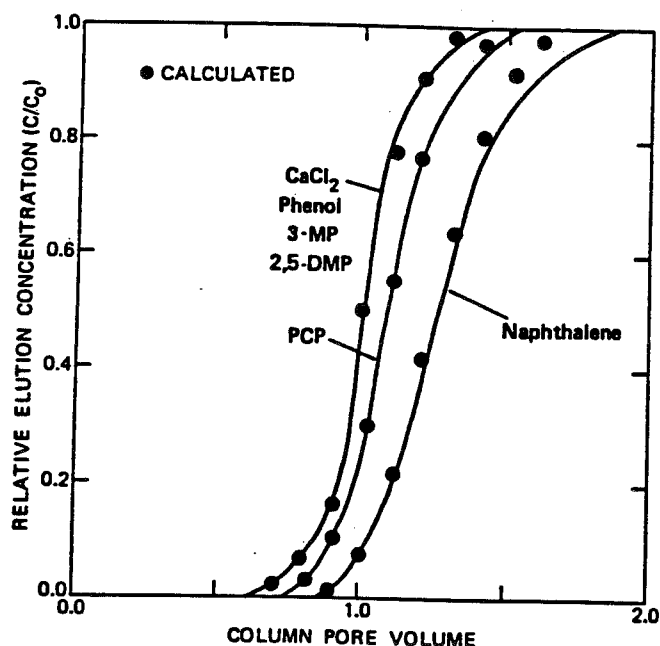


Figure V-29 : Courbe d'élution de PCP dans un sédiment saturé en eau
(d'après Goerlitz et al.1985)

A saturation partielle, le PCP a un comportement du même type que le traceur, les différences entre les courbes de restitution étant dues essentiellement aux variations des conditions hydriques.

L'analyse des paramètres ajustés à partir d'essais effectués à une même vitesse de Darcy mais à des teneurs en eau différentes permet de montrer

que la désaturation du sable entraîne essentiellement des variations de la structure de l'écoulement de l'eau. Nous observons, notamment, une augmentation de D , de $0,36 \text{ cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ à saturation à $9,25 \text{ cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ pour une teneur en eau correspondant à 66% de la saturation.

Par ailleurs, le coefficient d'échange α semble diminuer avec la teneur en eau, ce qui pourrait confirmer ce qui a été observé avec le traceur à savoir que l'eau immobile est essentiellement de l'eau piégée par des bulles d'air.

Enfin, il semble que le coefficient de disparition μ_d augmente avec la désaturation, puisqu'il passe de 0 à la saturation à $0,20 \text{ h}^{-1}$ à 66% de la saturation. Ceci tendrait à montrer que le taux d'interactions irréversibles est lié à la teneur en eau immobile et donc au paramètre f' .

Les divers effets observés tels que celui de la vitesse d'écoulement ainsi que celui de la concentration en PCP restent néanmoins de l'ordre de grandeur des imprécisions expérimentales et sont de toute façon beaucoup moins importants que ceux dûs au pH.

Dans ces conditions d'essais, et en colonnes de sable, le pH, qui contrôle la solubilité et le degré d'ionisation du PCP est le facteur le plus sensible, avec la teneur en eau qui règle la fraction d'eau immobile.

V-2 Transferts dans le sableensemencé avec *R. chlorophenolicus*

Après avoir caractérisé l'hydrodynamique et le comportement du PCP dans un sable pur, nous abordons une étape de complexité supérieure avec la prise en compte de la présence d'une biomasse active dans le milieu poreux.

V-2-1 Conditions expérimentales

a/ Préparation des bioréacteurs

Le matériau poreux n'a pas pu être mis en place de la même manière que les colonnes de sable stérile car la présence des cellules vivantes impose de maintenir un matériau humide.

Le protocole de mise en place a consisté à mélanger de manière homogène le sable sec avec une suspension de *R. chlorophenolicus*

cultivée en milieu riche (LB), lavée deux fois avec de l'eau et reprise, après centrifugation, par un volume adéquat de milieu MSX permettant d'une part d'introduire une quantité désirée de cellules et d'autre part une agitation correcte avec le sable.

Cette agitation douce a été effectuée pendant 24 heures à 28°C, après quoi nous avons laissé décanter la suspension et éliminé le surnageant. Un bilan sur les volumes de suspension initial et final suivi d'une numération sur milieu gélosé a permis d'estimer la densité cellulaire dans le sable.

Le sable humide a alors été introduit stérilement dans une colonne pharmacia de 2,6 cm de diamètre stérilisée aux rayons U.V. pendant 10 mn, par petites quantités, suivi d'un léger tassement à l'aide d'une spatule.

Nous avons préparé deux bioréacteurs, le premier nous a permis d'effectuer une mise au point méthodologique et de caractériser le comportement physico-chimique du KCl et du PCP en présence d'une biomasse alors que le second a été utilisé plus spécifiquement pour essayer de mettre en évidence la biodégradation.

b/ Caractéristiques des bioréacteurs

Le premier bioréacteur est constitué de 106 g de sable sec pour une hauteur de 12,5 cm, soit une densité sèche de $1,56 \text{ g.cm}^{-3}$ qui est une valeur assez proche de celles obtenues sans les bactéries ($1,75 \text{ g.cm}^{-3}$). La porosité correspondante est de 42% du volume total (soit 28 cm^3 de vides).

Le dénombrement des cellules bactériennes dans le sable a été effectué après extraction au mixer (Waring Blender) et étalement sur milieu gélosé riche. On a ainsi pu dénombrer 10^6 cellules.g⁻¹ de sable sec soit un total dans la colonne d'environ 10^8 cellules de *R. chlorophenolicus* qui correspondent approximativement à 0,1 mg de masse sèche bactérienne assimilable à un taux de matière organique de 0,000095% (en prenant comme masse sèche cellulaire : $m = 10^{-9} \text{ mg. cellule}^{-1}$ d'après, Chen et al. 1992).

Le second bioréacteur est constitué de 170 g de sable sec pour une hauteur de 19 cm soit une densité sèche de $1,68 \text{ g.cm}^{-3}$ d'où une porosité de 37% (soit 37 cm^3 de vides).

Le dénombrement des cellules a également été effectué après extraction et étalement sur milieu gélosé. Ce réacteur contient environ 6.

10^7 cellules.g⁻¹ de sable sec soit un total dans la colonne de 10^{10} cellules de *R. chlorophenolicus* ce qui correspond à une masse d'environ 10 mg de masse sèche bactérienne assimilable à un taux de matière organique de 0,006%.

Les bioréacteurs sont soumis à un écoulement permanent en prenant le milieu MSX comme solution d'alimentation. Les solutés (traceur et PCP) sont injectés dans les colonnes après dissolution dans ce même milieu (MSX 10 et MSX KCl).

V-2-2 Essais avec le premier bioréacteur

V-2-2-1 Transfert de KCl

Dans le but de vérifier si la présence de bactéries ne modifie pas les caractéristiques hydrodynamiques du sable, le bioréacteur a été sollicité par des créneaux de traceur de l'écoulement (KCl). Les résultats sont présentés figure V-30.

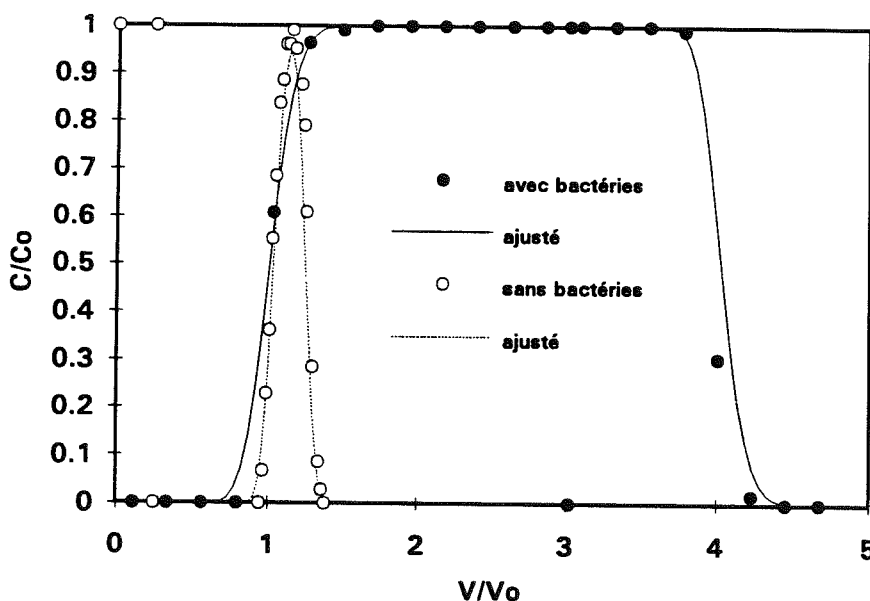


Figure V-30 : Courbe d'élution du traceur dans le sableensemé avec *R. chlorophenolicus* (colonnes S₁ et S₄)

On peut observer sur cette figure que les courbes d'élution du traceur (KCl) dans le bioréacteur passent par le point (1; 0,5) et présentent

des fronts de montée et descente en concentration semblables à ceux de la courbe obtenue dans le sable stérile.

L'ajustement des paramètres hydrodynamiques sur ces courbes est présenté dans le tableau V-7.

	sans bactéries (S1)	avec bactéries (S4)
v (cm.h ⁻¹)	5,59	5,7
Pulse	0,194	3,02
Péclet	793	200
R	1,03	1,01
β	0,99	0,989
ω	10	0,5
D (cm ² .h ⁻¹)	0,31	0,35
K (cm ³ .g ⁻¹)	0,006	0,003
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,34	0,405
α (h ⁻¹)	∞	0,093

Tableau V-7 : Ajustement des paramètres sur la courbe de restitution du KCl dans le bioréacteur (colonnes S1 et S4)

Au niveau de l'ajustement des paramètres, on note une légère augmentation du coefficient de dispersion qui passe de 0,124 à 0,480 cm².h⁻¹.

Il est difficile d'attribuer cette variation uniquement à l'effet des bactéries dans la mesure où les porosités du bioréacteur et de la colonne de sable stérile sont légèrement différentes (par l'intermédiaire de la densité sèche).

D'autre part, les différences entre les courbes de restitution sont de l'ordre de grandeur des fourchettes d'erreurs expérimentales.

Il semble néanmoins que la présence des bactéries ainsi que le mode de mise en place n'aient pas affecté de manière significative l'hydrodynamique du sable.

V-2-2-2 Transfert de PCP

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle biodégradation du PCP, nous avons comparé le comportement de cellules actives et de cellules inactives (témoin). Pour cela nous avons faits des essais de transfert de PCP dans le bioréacteur saturé en eau à deux températures différentes : à 23°C et à 4°C. On suppose alors que l'effet de la température sur l'écoulement peut être négligé et que les bactéries sont inactives à 4°C (ce qui semble acceptable).

a/ Essais de transfert de PCP à 23°C

Une courbe type de restitution du PCP à 23°C, est présentée figure V-31 et comparée à une courbe de restitution du PCP obtenue dans le sable stérile saturé à une vitesse d'écoulement proche.

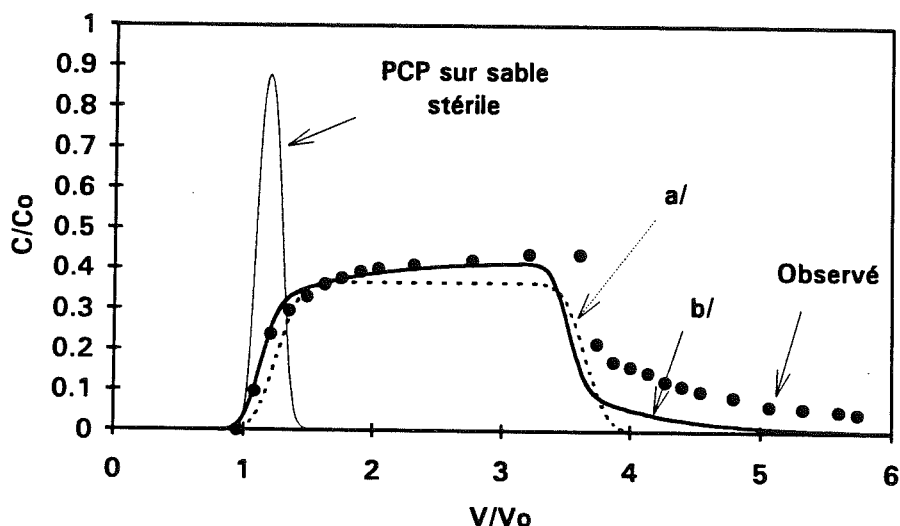


Figure V-31 : Courbe d'élution du PCP dans le bioréacteur à 23°C, comparée à celle obtenue dans le sable stérile (colonne S₁ et S₄)

Cette courbe a été obtenue de manière très reproductible sur trois essais, et les taux de récupération du PCP semblent constants (environ 40%)

Les essais ont été effectués à un débit d'environ 12 ml.h⁻¹ correspondant à une vitesse de Darcy de 2,26 cm.h⁻¹.

Au cours de ces essais, nous avons suivi le pH de la solution (milieu MSX) ainsi que la concentration en ions chlorures qui sont deux

paramètres caractéristiques de la biodégradation du PCP. Les dosages de PCP ont été effectués par HPLC, les dosages par spectrophotométrie U.V. étant impossibles compte tenu des interférences causées par les cellules bactériennes.

Nous avons pu constater que le pH ne varie pas de manière significative et que la concentration en chlorures dans le milieu reste nulle (à la précision des mesures près) tout au long de l'essai. Ces observations, plus le fait qu'aucun produit de dégradation du PCP n'a pu être observé, indiquent qu'il n'y a pas eu de biodégradation au cours de ces essais.

A partir de cette courbe, nous avons ajusté les paramètres de deux manières différentes :

- . en utilisant les paramètres hydrodynamiques déterminés indépendamment avec le traceur de l'écoulement, et dans ce cas on n'ajuste que les paramètres R et Ψ (ajustement a).
- . en ajustant tous les paramètres pour décrire au mieux les points expérimentaux (ajustement b). Les résultats obtenus sont comparés à ceux relatifs au traceur dans le bioréacteur et au PCP dans le sable stérile.

Paramètres utilisés	KCl (1 g.l ⁻¹) (S4)	PCP (10 mg.l ⁻¹) (S1)	a/ (S4)	b/ (S4)
v (cm.h ⁻¹)	5,7	5,58	5,2	5,2
Pulse	3,02	0,214	2,39	2,39
Péclet	200	995	200	200
R	1,01	1,08	1,35	1,4
β	0,989	0,986	0,989	0,8
ω	0,5	0,5	0,5	0,5
Ψ	0	0,024	1	0,7
D (cm ² .h ⁻¹)	0,35	0,25	0,325	0,325
K (cm ³ .g ⁻¹)	0,003	0,018	0,0875	0,1
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,405	0,357	0,405	0,34
α (h ⁻¹)	0,093	0,023	0,085	0,085
μ_d (h ⁻¹)	0	0,003	0,416	0,29

Tableau V-8 : Ajustement des paramètres sur la courbe de restitution du PCP dans le bioréacteur (colonnes S₁ et S₄)

b/ Essais de transfert de PCP à 4°C

Afin de différencier la part de fixation du PCP de manière active par les cellules (bioaccumulation) de la fixation passive (adsorption sur la

biomasse), nous avons effectué des essais de transfert de PCP à 4°C où les cellules sont sensées être inactives.

Les résultats (répétés deux fois) sont présentés figure V-32 et comparés aux résultats obtenus à 23°C (figure V-31 et tableau V-8).

Nous avons observé un taux de récupération d'environ 70%, qui est inférieur à celui relatif à une même vitesse dans le sable (environ 90%) mais nettement supérieur à celui obtenu à 23°C dans le bioréacteur (environ 40%).

Comme précédemment, nous avons ajusté les paramètres sur les courbes expérimentales, en prenant en compte (ajustements a, b, c) ou non, (ajustement d) les paramètres déterminés à l'aide du traceur. Une étude de sensibilité au paramètre μ_d est présentée figure V-32 et dans le tableau V-9 ("ajustements" a, b, c).

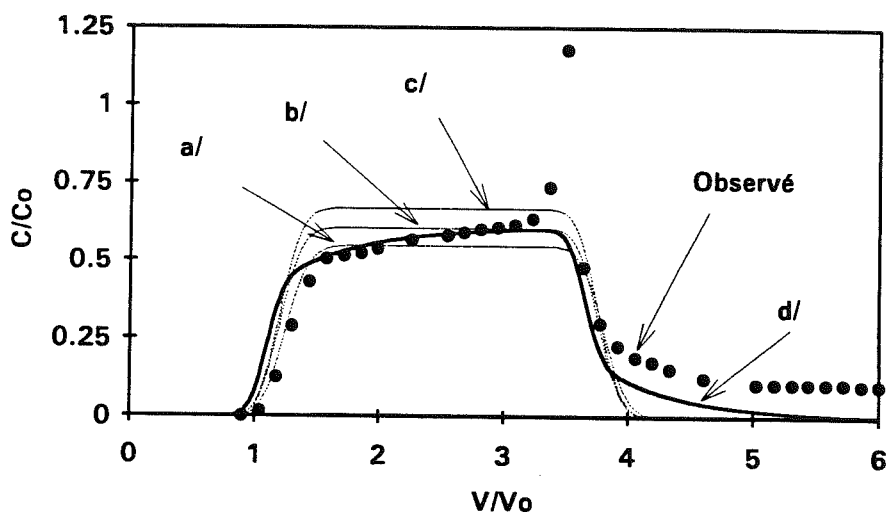


Figure V-32 : Courbe de restitution du PCP (10 mg.l⁻¹) dans le bioréacteur à une température de 4°C (colonne S₄)

Dans le cas d, nous avons essayé de simuler au mieux les points expérimentaux, en ajustant simultanément les paramètres R , β , ω et Ψ .

Les résultats présentés figure V-32 et dans le tableau V-9 montrent essentiellement que la prise en compte de la "disparition" du PCP par un seul coefficient de disparition μ_d constant n'est pas suffisante pour décrire correctement les résultats expérimentaux. Ceux ci peuvent être représentés plus finement en ne tenant pas compte des résultats obtenus avec le traceur. En particulier, quelle que soit la température de l'essai, on

constate qu'il faut abaisser le paramètre β jusqu'à 0,8 pour obtenir une simulation satisfaisante des points expérimentaux (palier entre 1,5 et 3,5 V/V_0 et trainée pour $V/V_0 > 3,9$).

Température	23°C	a	b	c	d
v (cm.h ⁻¹)	5,2	5,6	5,6	5,6	5,6
Pulse	2,39	2,56	2,56	2,56	2,56
Péclet	200	200	200	200	200
R	1,4	1,2	1,2	1,2	1,35
β	0,8	0,989	0,989	0,989	0,8
ω	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ψ	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4
D (cm ² .h ⁻¹)	0,325	0,35	0,35	0,35	0,35
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,34	0,405	0,405	0,405	0,34
α (h ⁻¹)	0,085	0,092	0,092	0,092	0,092
μ_d (h ⁻¹)	0,24	0,24	0,20	0,16	0,13

Tableau V-9 : Ajustement des paramètres sur les courbes de restitution du PCP à 4°C et à 23°C (colonne S₄).

Toutefois, ceci est difficile à concevoir physiquement dans la mesure où il faut admettre que 20% de l'eau est devenue immobile dans la colonne (entre le traceur de l'écoulement et le PCP).

Le pic de concentration ($C/C_0 > 1$) observé sur la courbe de restitution, figure V-32, entre $V/V_0 = 3,6$ et $V/V_0 = 3,8$ est observable de manière reproductible 1 volume de pore après la fin de l'injection du soluté. Nous avons donc attribué cette particularité de la courbe à l'effet de la variation de la concentration en PCP qui peut provoquer la destabilisation des cellules (sur lesquelles s'est fixée une fraction du PCP) dans le bioréacteur et leur entrainement avec l'eau mobile vers la sortie de la colonne.

A la suite de ces essais à 4°C, nous avons effectué de nouveaux essais à 23°C qui ont montré, eux aussi, l'apparition d'un pic semblable.

Nous ne pouvons donc pas attribuer ces pics de concentration à un effet direct de la température. L'analyse de la chronologie des essais de transfert de PCP et de KCl nous permet d'envisager une explication plus

plausible. Les premiers essais ont été effectués en utilisant uniquement des solutions de PCP à 23°C, puis nous avons injecté deux créneaux de KCl à 1 g.l^{-1} de 3 volumes de pore chacun. Par la suite, nous avons injecté deux créneaux de PCP à 4°C où l'on a observé les premiers pics de concentration en PCP ($C/C_0 > 1$) et que l'on a retrouvés dans les essais suivants à 23°C.

Il semble donc que les pics de concentration en PCP observés en fin de courbes de restitution soient consécutifs au passage de chlorures (forme KCl) dans le bioréacteur.

Pour vérifier l'effet du chlore, nous avons choisi de poursuivre l'étude avec un deuxième bioréacteur, pour suivre en particulier le nombre de cellules lessivées au cours des essais de transferts.

V-2-3 Essais avec le second bioréacteur

a/ Transfert de KCL

Les essais de transfert dans le second bioréacteur ont été effectués avec un débit plus faible que précédemment : environ 1 ml.h^{-1} .

Les principaux paramètres hydrodynamiques ont été déduits d'une courbe d'élution de KCl (figure V-33).

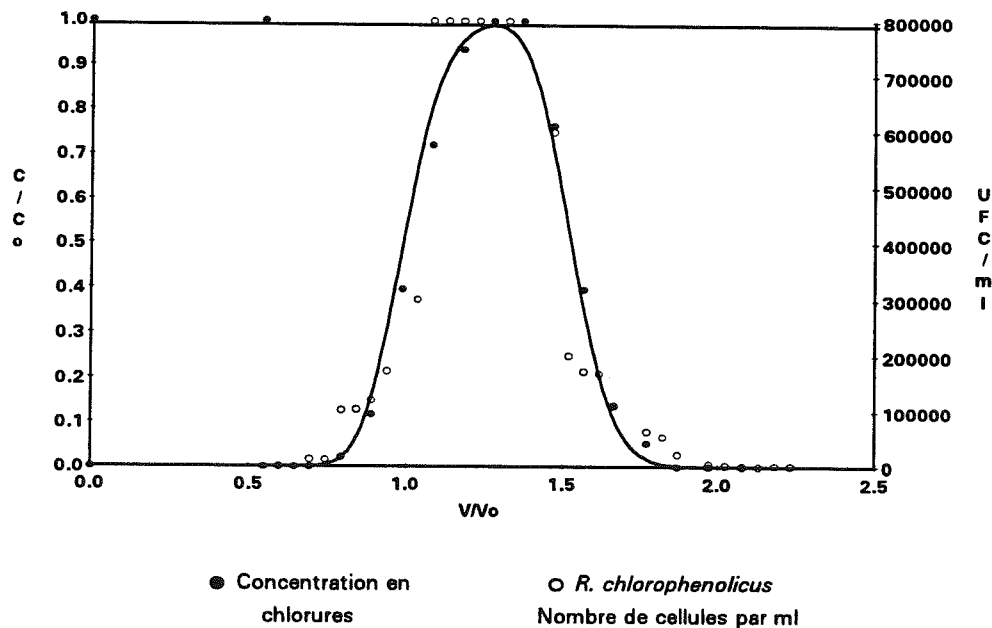


Figure V-33 : Courbe d'élution du traceur dans le second bioréacteur (colonne S5)

Les paramètres sont présentés dans le tableau V-10.

	1er Bioréacteur (S4)	2e Bioréacteur (S5)
v (cm.h ⁻¹)	5,2	0,64
Pulse	3,02	0,54
Péclet	200	180
R	1,01	1,0
β	0,989	0,99
ω	0,5	1
D (cm ² .h ⁻¹)	0,35	0,067
K (cm ³ .g)	0,003	0
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,405	0,366
α (h ⁻¹)	0,093	0,012

Tableau V-10 : Ajustement des paramètres sur la courbe d'élution du KCl dans le second bioréacteur et comparaison avec le bioréacteur précédent (colonnes S4 et S5)

Pour les deux bioréacteurs, les paramètres sont proches. Seul le coefficient de dispersion varie sensiblement de 0,35 à 0,067 cm².h⁻¹. La valeur de ce coefficient de dispersion se rapproche de celle calculée avec le sable stérile saturé pour une même vitesse d'écoulement : 0,055 cm².h⁻¹ (tableau V-1). Ceci semble confirmer l'hypothèse d'un effet de la densité sèche sur l'écoulement, car la densité sèche du deuxième bioréacteur est plus proche de celle mesurée avec le sable stérile.

Au cours de cet essai de transfert du KCl, nous avons suivi simultanément le nombre de cellules de *R. chlorophenolicus* recueillies dans la solution. On peut voir figure V-31 que la concentration en cellules dans l'elluant varie exactement en phase avec la concentration en KCl. Entre $V/V_0 = 1,1$ et $V/V_0 = 1,4$, il semble que la concentration en cellules soit constante et égale à 800000 UFC ml⁻¹.

Il ne s'agit que d'un artéfact expérimental. En effet, le lessivage cellulaire ayant été plus forte que prévu, les dilutions utilisées pour les dénombrements sur milieu solide, n'ont pas été suffisantes, nous avons donc obtenu un tapis bactérien sur les milieux de culture.

On peut donc supposer que les concentrations élevées en KCl (1 g.l^{-1}) entraînent une fragilisation du biofilm cellulaire dans le bioréacteur. Les cellules sont alors devenues sensibles à des variations brutales de concentration en PCP ou en chlorures qui ont pu favoriser leur lessivage, entraînant avec elles des quantités importantes de soluté.

Lors des injections de KCl, compte tenu de la valeur élevée de la concentration utilisée (1 g.l^{-1}) et du faible taux de bioaccumulation de ce produit dans les cellules (le chlore est exclu du cytoplasme) aucun pic de concentration en chlore n'a été mis en évidence.

Le nombre élevé de cellules lessivées lors du passage du KCl dans le bioréacteur confirme les observations de nombreux auteurs (Charaklis 1980, Quioc 1990, Le Chevalier et al. 1988) qui présentent le chlore (et les chlorures) comme un produit très efficace pour limiter le développement néfaste de certains biofilms dans les conduites d'eau.

D'autres auteurs ont montré, par ailleurs, que l'adhésion des cellules sur les surfaces dépendaient de leur propriétés de surface qui peuvent être altérées, entre autre, par des variations de force ionique de la solution (Marlow et al. 1991).

Ces propriétés de surface sont essentiellement l'hydrophobicité et la présence de polysaccharides, toutes deux dépendantes de la nature des nutriments. Tout comme le chlore, il semble que les chlorophénols affectent la structure de la membrane cytoplasmique des cellules, limitant ainsi leur adhésion sur les surfaces minérales (Quioc 1990, Shair 1971).

b/ Transfert de PCP

Les essais obtenus sur le premier bioréacteur avec le PCP n'ayant pas permis de mettre en évidence sa biodégradation, nous avons modifié deux paramètres.

D'abord, nous avons augmenté le nombre total de cellules bactériennes présentes dans le bioréacteur en augmentant la densité de population et la masse de bioréacteur. Ensuite, nous avons effectué les essais de transfert à une vitesse beaucoup plus faible que précédemment en la réduisant de $5,2 \text{ cm.h}^{-1}$ à $0,64 \text{ cm.h}^{-1}$. La vitesse précédente était trop élevée pour être compatible avec les temps caractéristiques de la biodégradation.

En effet, nous avons observé (chapitre IV) qu'à cette concentration de PCP, la vitesse de dégradation est d'environ $0,95 \cdot 10^{-18} \text{ mole.h}^{-1}$.

cellule⁻¹ soit 25 ng de PCP.h⁻¹ pour 10⁸ cellules (nombre de cellules présentes dans le bioréacteur). Compte tenu de la vitesse d'écoulement et de la longueur du bioréacteur, on peut estimer le temps de séjour du PCP à environ 3 heures. On peut donc prévoir, dans le meilleur des cas, une dégradation de 75 ng de PCP, soit une libération de 50 ng de chlorures dans le milieu, ce qui est de l'ordre de grandeur de la limite de détection de la méthode analytique utilisée. Il est donc normal que nous n'ayons pas observé de dégradation au cours de ces essais.

Avec un débit 10 fois plus faible correspondant à une vitesse de pore d'environ 0,6 cm.h⁻¹ le temps de séjour approximatif des molécules est de 30 heures. Ce temps de séjour est encore faible comparé aux temps caractéristiques de biodégradation.

Le temps caractéristique de dégradation du PCP à 10 mg.l⁻¹ est d'environ une semaine (figure IV-11). Nous avons effectué des essais de transfert de PCP avec arrêt de l'écoulement pendant 8 jours pour permettre un temps de contact compatible avec la biodégradation. Les résultats ainsi obtenus sont présentés figure V-34.

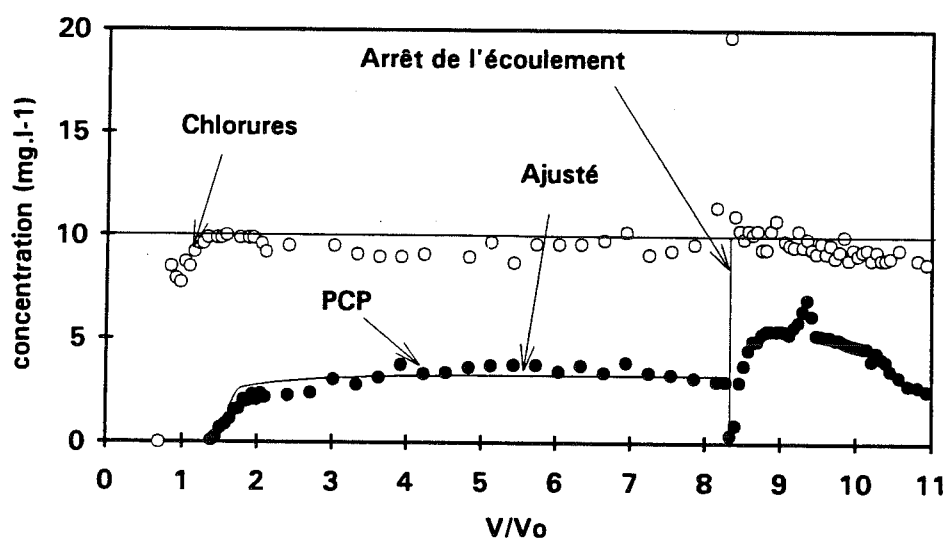


Figure V-34 : Courbe d'élution du PCP à 10 mg.l⁻¹ dans le second bioréacteur avec arrêt de l'écoulement pendant 8 jours (colonne S5)

Nous avons suivi les concentrations en PCP et en chlorures en sortie de colonne par CLHP. Pour le PCP, on observe une courbe similaire à celles obtenues avec le premier bioréacteur avec un plateau à environ 0,4 C/Co (Co = 10 mg.l⁻¹) et un léger retard par rapport au KCl (figure V-33). L'ajustement des paramètres correspondants à la partie de la courbe de 0 à

8 volumes de pore est présenté dans le tableau V-11 et comparé à celui effectué sur la courbe de PCP à 23°C dans le premier bioréacteur.

	1er bioréacteur (S4)	2e bioréacteur (S5)
v (cm.h ⁻¹)	5,2	0,76
Pulse	2,39	8,3
Péclet	200	180
R	1,4	2
β	0,8	0,8
ω	0,5	0,5
Ψ	0,7	0,9
D (cm ² .h ⁻¹)	0,406	0,1
K (cm ³ .g)	0,105	0,22
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,34	0,296
α (h ⁻¹)	0,085	0,007
μ_d (h ⁻¹)	0,29	0,036

Tableau V-11 : Ajustement des paramètres sur la courbe de restitution du PCP à 10 mg.l⁻¹ dans le second bioréacteur (colonne S5)

Après arrêt de l'écoulement de la solution de PCP pendant environ 8 jours, nous nous attendions à observer, après la remise en écoulement, l'absence de PCP pendant un volume de pore si le PCP présent dans le bioréacteur était totalement dégradé.

Nous avons effectivement observé une chute de concentration mais seulement pendant 0,2 volume de pore. La dégradation du PCP n'a eu lieu que sur une fraction du volume du bioréacteur. Cette diminution de concentration en PCP est accompagnée d'une augmentation de la concentration en chlorures preuve de la dégradation partielle du pesticide lors de l'arrêt de l'écoulement.

En effet, on peut observer sur la figure V-34 que la concentration en ions chlorures reste stable à un niveau correspondant à celui de la solution d'injection (sortie à environ 1 volume de pore) au cours des huit premiers volumes de pore écoulés. La concentration observée, lors de la remise en écoulement consécutive à l'arrêt de huit jours, est de 19 mg.l⁻¹ correspondant à une augmentation de concentration d'environ 10 mg.l⁻¹.

Cette variation de concentration en ions chlorures implique qu'une quantité de PCP a été biodégradée lors de l'arrêt de l'écoulement.

Au cours de cet essai, nous avons suivi l'évolution du nombre de cellules de *R. chlorophenolicus* en sortie de colonne (figure V-35) par dénombrement indirect sur milieu gélosé. Ce suivi concerne les trois premiers volumes de pore écoulés.

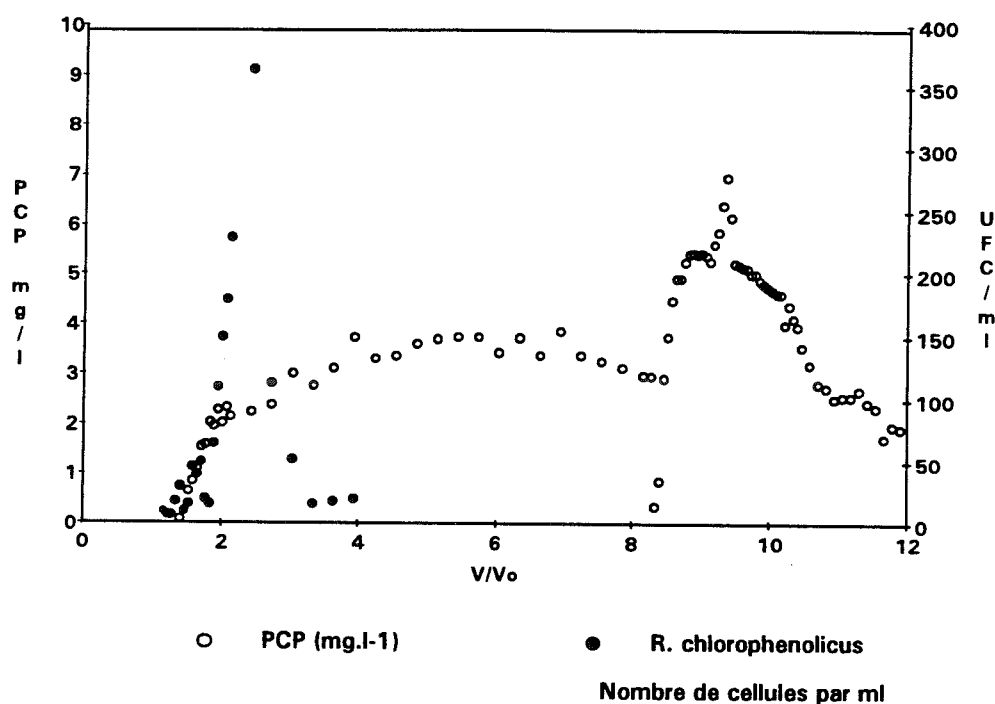


Figure V-35 : Suivi du nombre de cellules au cours du transfert de PCP dans le second bioréacteur (colonne S₅)

On peut observer un pic de concentration en bactéries au moment où la concentration en PCP augmente. Cependant, l'augmentation du nombre de cellules est moins élevée que dans l'essai relatif au KCl. La déstabilisation des cellules est fonction de la concentration en soluté (ou de la force ionique) et semble également sensible à une variation brutale de concentration. Dans le cas de l'injection du PCP, qui a été faite sous forme d'échelon, dès que la concentration en sortie de colonne est stabilisée, le nombre de cellules retombe à son niveau de base (environ 20 cellules.ml⁻¹)

Ce résultat pourrait donc expliquer les pics de concentration en PCP à $C/C_0 > 1$ observés dans le premier bioréacteur. Ceux ci seraient dûs à la libération massive de cellules sur lesquelles est fixé du PCP, lors de la

chute brutale de la concentration provoquée par l'arrêt de l'injection du PCP (remplacé par le milieu MSX).

Plus que la concentration en PCP, qui est relativement faible, on peut penser que cet effet est dû à la concentration en ions ajoutés à la solution lors de sa préparation. En effet, les solutions de PCP sont préparées en élevant le pH par ajout de potasse (KOH, N/100) permettant la solubilisation du PCP puis neutralisation avec de l'acide sulfurique.

Ce faisant, nous introduisons dans le milieu du sulfate de potassium à environ 10^{-2} M qui n'est pas présent dans les milieux sans PCP (MSX, solution du sol). Ceci crée donc une différence de force ionique qui peut modifier l'adhésion des cellules et faciliter leur lessivage.

Par ailleurs, on peut observer une légère augmentation de la concentration en PCP après l'écoulement d'environ 9 volumes de pore, ce qui peut s'expliquer par une déstabilisation des cellules contenant du PCP provoquée par la remise en écoulement de la solution de PCP (MSX 10).

V-2-4 Discussion

Les résultats obtenus avec les deux bioréacteurs nous ont permis de montrer que la présence de cellules bactériennes dans le sable de Fontainebleau ne modifie pas de manière significative les caractéristiques hydrodynamiques du matériau. Les différences observées au niveau du coefficient de dispersion peuvent être expliquées par la variation des caractéristiques physiques du milieu (densité sèche) dépendantes du mode de mise en place.

Certains auteurs ont pu observer que le développement cellulaire dans des milieux poreux aquifères provoque des variations des caractéristiques hydrodynamiques de ces milieux et en particulier de la conductivité hydraulique ou de la perméabilité (Vandevivere & Baveye 1992, Cunningham et al. 1991). Les effets sont également sensibles sur la dispersion mécanique, par augmentation des frottements et par colmatage d'une partie de la porosité.

Dans notre cas, compte tenu du fait que nous n'injectons pas d'autre source de carbone dans le milieu que le PCP, il est peu probable qu'il y ait une croissance cellulaire susceptible de modifier les caractéristiques du milieu.

En se basant sur le nombre de cellules introduites dans les bioréacteurs, et en prenant comme taille moyenne pour une cellule cylindrique : $2 \times 1 \mu\text{m}$, on peut estimer le volume de la biomasse : $0,16 \text{ mm}^3$ et 16 mm^3 respectivement pour le premier et le deuxième bioréacteurs. Ces volumes représentent respectivement 0,0002 et 0,016% du volume des bioréacteurs, valeurs trop faibles pour envisager une diminution significative de la porosité totale.

En ce qui concerne le transfert de PCP, nous avons pu observer une différence de comportement assez nette par rapport au sable stérile, en particulier au niveau du taux de récupération en sortie de colonne.

Avec les essais effectués avec le sable stérile, le taux de récupération était d'environ 90% alors que sur le bioréacteur à 4°C , on observe un taux de récupération de 70%. Il semble donc que la présence de cellules dans le milieu poreux, même inactives, entraîne la disparition de 20% du produit injecté, ce qui est très nettement supérieur aux effets dûs aux variations hydrodynamiques constatées avec le KCl dans le sable stérile.

De plus, avec les essais faits à la température de 23°C avec des cellules actives, les taux de récupération chutent à 40% ce qui signifie qu'environ 30% du PCP disparu serait attribuable à une fixation active par les cellules. Ces résultats mettent donc en évidence l'importance des phénomènes d'interaction avec la biomasse active ou non. Cette biomasse ne représente, au plus, qu'un taux de 0,0001% de matière organique. Ce phénomène semble donc être prépondérant, au moins dans les colonnes de sable où il n'y a quasiment pas d'autres sites d'interactions et où les cellules sont placées artificiellement, probablement en position de contact très favorable avec les molécules de PCP. Ceci peut être confirmé par le calcul de $\log K_{oc}$ ($K_d/\%$ carbone organique) qui est respectivement de 5,2 et 4,8 pour le premier et le second bioréacteur, alors que celui calculé dans le chapitre II avec le sol cultivé est 2,6. La biomasse des bioréacteurs est donc plus interactive avec le PCP que la matière organique du sol (beaucoup moins accessible).

L'apparition des pics de concentration $C/C_0 > 1$ observés sur les courbes de restitution de PCP est liée à la bio-accumulation des produits organiques sur (ou dans) les cellules, couplée à la déstabilisation de ces cellules, mécaniquement (variation de débit) ou chimiquement (variations de concentrations ou de force ionique et action chimique sur les cellules).

Dans la mesure où ces phénomènes peuvent intervenir en conditions naturelles, il n'est pas impossible que ces processus de transport particulaire de composés organiques soient fréquents dans les sols. Ceci sera confirmé avec les colonnes de sol.

En ce qui concerne la dégradation du PCP, nous avons pu voir avec le premier bioréacteur, qu'il n'y a pas eu biodégradation au cours du transfert. La cause principale semble être l'incompatibilité des temps caractéristiques de dégradation et de transfert du soluté. Par ailleurs, *R. chlorophenolicus* étant une bactérie aérobie, en absence d'oxygène dissous dans la solution de percolation, il est normal de ne pas observer de dégradation dans le bioréacteur saturé en eau.

Avec le second bioréacteur, le PCP présente sensiblement le même comportement avec des interactions plus élevées ($R = 2$) que dans le premier bioréacteur ($R = 1,4$), certainement en raison du nombre plus élevé de cellules présentes.

De même, le coefficient de disparition adimensionnel (Ψ) augmente de 0,7 à 0,9, ce qui correspond cependant à une baisse du coefficient dimensionnel à cause de la différence des vitesses d'écoulement.

Comme pour le premier bioréacteur, la biodégradation du PCP (que nous assimilons à la libération d'ions chlorures) ne s'observe pas en présence d'un écoulement mais seulement lorsque celui-ci est stoppé suffisamment longtemps. Bien qu'une quantité significative d'ions chlorures aient été relarguée dans le milieu, nous n'avons pas observé de produits de dégradation du PCP. On peut donc supposer qu'ils sont soit dégradés à leur tour jusqu'à la libération de CO_2 , soit très fortement retenus par la biomasse.

Le faible taux de dégradation observé peut s'expliquer par la présence d'oxygène en faible quantité (dissous) dans le milieu, alors qu'il est indispensable au fonctionnement des cellules de *R. chlorophenolicus*.

Il apparaît donc, que la présence des cellules de *R. chlorophenolicus* dans le sable de Fontainebleau provoque l'apparition de quatre nouveaux phénomènes par rapport à ceux observés dans le sable stérile : de l'adsorption sur les cellules, de la bioaccumulation, de la biodégradation (faible) et du transport particulaire apparemment très importante.

V-3 Transferts dans le sol cultivé

Cette étape de l'étude est relative à la prise en compte d'une part l'effet de la matière organique des sols et d'autre part l'effet de la structuration en agrégat.

Le sol prélevé sur le site expérimental de de La Côte Saint André cultivé, tamisé à 2 mm, a été introduit dans les colonnes selon le protocole décrit dans l'annexe 2.

Après remplissage, les colonnes sont mises en équilibre chimique, par circulation de fluide en circuit fermé avec 2 litres d'eau distillée qui serviront à la préparation des solutions de PCP ou de KCl selon la méthode décrite aux paragraphes V-A/3 et V-A/4.

Les colonnes saturées en eau ainsi obtenues, sont soumises à un écoulement permanent d'eau avec des injections de traceur ou de PCP. Les débits constants utilisés sont d'environ 1,5 et 4 ml.h⁻¹, soit des vitesses de pore de 0,4 et 1,5 cm.h⁻¹. Les colonnes de sol ayant une longueur d'environ 20 cm, les temps de séjours approximatifs du solvant sont de 15 à 40 heures.

V-3-1 Transfert du traceur

Les analyses chimiques de chlorures et les conditions expérimentales étant les mêmes que précédemment, les erreurs sur les courbes de restitution relatives au sol sont les mêmes que celles obtenues sur le sable.

Deux courbes de restitution de chlore, relatives au sol, sont présentées figure V-36 et les résultats des ajustements des paramètres correspondants sont dans le tableau V-11.

Les taux de récupération obtenus sont respectivement de 98% et 99% pour les créneaux de 0,2 et 1 volume de pore.

Les paramètres ajustés sur les deux courbes sont peu différents, confirmant ainsi que la taille du créneau influe peu sur la caractérisation des paramètres hydrodynamiques.

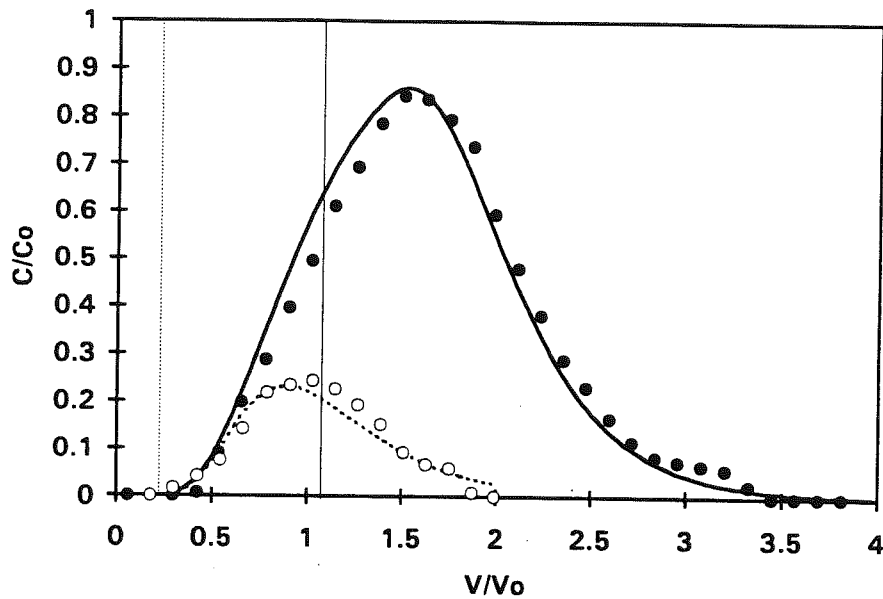


Figure V-36 : Courbes d'élution du traceur dans le sol non stérile saturé en eau (colonne L1)

	Sol		Sable
v (cm.h ⁻¹)	1,36	1,36	1,83
créneau	1,14	0,219	0,216
Péclet	10	10	650
R	1,0	1,0	1,03
β	0,85	0,9	0,985
ω	0,5	1	20
D (cm ² .h ⁻¹)	2,58	2,58	0,124
K (g.cm ⁻³)	0	0	0,006
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,425	0,45	0,34
α (h ⁻¹)	0,015	0,032	∞

Tableau V-11 : Ajustement des paramètres sur la courbe d'élution de KCl dans le sol, comparés à ceux obtenus dans le sable à une vitesse proche (colonne L1 et S1)

Les paramètres ajustés permettent de décrire correctement les courbes d'élution du traceur. De plus, l'ion chlorure se comporte comme un traceur de l'écoulement dans le sol ($R = 1$ et bilan de masse # 1). Il

existe une quantité d'eau immobile à saturation en eau, (10 à 15%), bien plus importante que dans le sable de Fontainebleau saturé en eau (1%).

Par ailleurs, les valeurs de ω ajustées montrent qu'il existe une cinétique de transfert du soluté entre les deux fractions d'eau, contrairement à la plupart des résultats obtenus dans le sable saturé où l'on peut considérer cet échange comme instantané. Cet échange explique la dissymétrie des courbes obtenues et en particulier la trainée en fin de restitution.

On peut noter, figure V-37, un aplatissement et un élargissement de la courbe de restitution du KCl dans le sol par rapport à celle obtenue dans le sable, significatifs d'un plus grand effet dispersif du sol dû à sa structuration en agrégats et à une distribution de tailles de pore plus large.

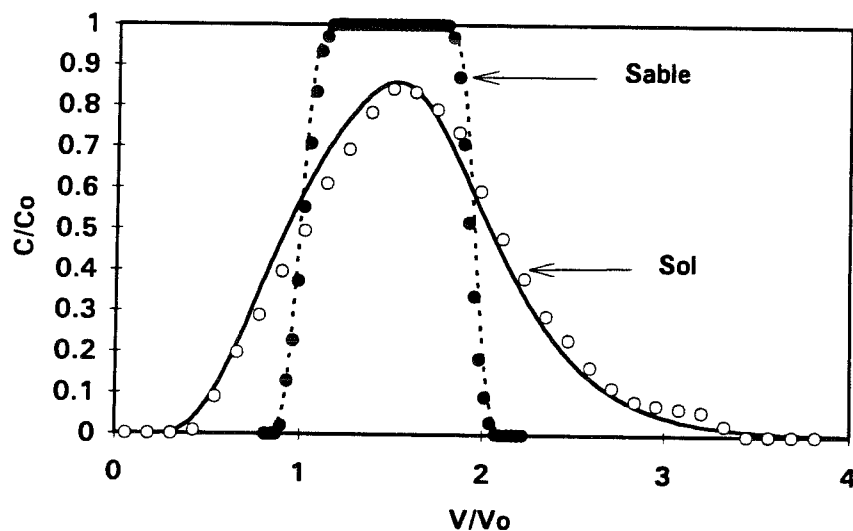


Figure V-37 : Courbes d'élution du traceur dans le sable et dans le sol saturés en eau (colonnes L1 et S2)

Ceci conduit à la diminution du paramètre Péclet qui passe de 650 dans le sable à 10 dans le sol pour une même vitesse d'écoulement, soit une augmentation du coefficient de dispersion de 0,124 à 2,72 cm².h⁻¹ (tableau V-11).

V-3-2 Transfert de PCP

Au cours des essais de transfert dans le sol, nous avons été confrontés au problème de lessivage particulaire conduisant à terme au colmatage des colonnes (annexe 16).

Il a été difficile d'effectuer plusieurs injections de solutés dans une même colonne de sol. Nous avons donc préparé après chaque essai une nouvelle colonne de sol en supposant que les caractéristiques hydrodynamiques déterminées avec la première colonne étaient transposables aux autres colonnes.

Cette hypothèse semble admissible, car la mise en place du sol est très reproductible. On obtient une densité sèche de $1,33 \pm 0,05 \text{ g.cm}^{-3}$ et deux essais de transfert de KCl effectués sur deux colonnes différentes ne présentaient aucune différence entre eux (aux erreurs de mesures près).

Le lessivage particulaire a été observé surtout lors de la mise en purge des colonnes après l'injection de PCP, phénomène que nous avons attribué à une variation brutale de la force ionique de la solution du sol. La méthode de préparation des solutions de PCP contraint à introduire une quantité importante de K_2SO_4 (0,01 M) qui est absente dans la solution sans PCP injectée à la suite des créneaux. Comme dans les bioréacteurs, la variation de la force ionique des solutions injectées semble destabiliser une fraction des constituants du sol.

Pour ces raisons, et compte tenu de la durée des expérimentations, les essais n'ont pas pu être répétés. Par conséquent, ces résultats, bien qu'obtenus en conditions parfaitement contrôlées, ne pourront être définitivement admis qu'après confirmation.

V-3-2-1 Effet de la stérilisation du sol

Afin de nous placer dans des conditions d'écoulement proches de celles du terrain, nous avons effectué les essais de transfert de PCP à une vitesse la plus basse possible, d'environ $0,5 \text{ cm.h}^{-1}$. Les concentrations en PCP choisies sont de 50 et 100 mg.l^{-1} .

Les créneaux d'injection ont été choisis très larges (environ 10 volumes de pore) en raison des fortes interactions attendues entre le PCP

et le sol ainsi que du fort effet dispersif de ce sol qui tend à étaler et à aplatisir les courbes de restitution.

Les résultats sont présentés figure V-38 où l'on peut observer que le PCP ressort de la colonne de sol stérile et non stérile approximativement en même temps, conduisant à des facteurs de retard très semblables (tableau V-12). Les courbes prédites à partir des coefficients d'équilibre issus des isothermes obtenues en batch sont également présentées ainsi que les paramètres correspondants. Les coefficients de partage solide-liquide étant dépendants du pH (cf figure II-12) nous avons utilisé ceux déterminés au pH le plus proche de celui observé dans les colonnes de sol, à savoir un pH d'environ 7 (étonnamment élevé, compte tenu du pH eau de ce sol qui est de 6).

On observe un léger décalage entre les courbes expérimentales que l'on ajuste "à l'oeil", avec les courbes prédites sur la base du paramètre K_d déterminé en batch avec les deux types de sols.

Les décalages observés correspondent à de faibles différences de K_d . Il semble que les K_d ajustés sur les courbes de restitution en sortie de colonnes de sol sont plus faibles que ceux déterminés à l'équilibre en batch, ce qui conduit à considérer l'existence d'effets cinétiques sur les interactions avec la matrice solide.

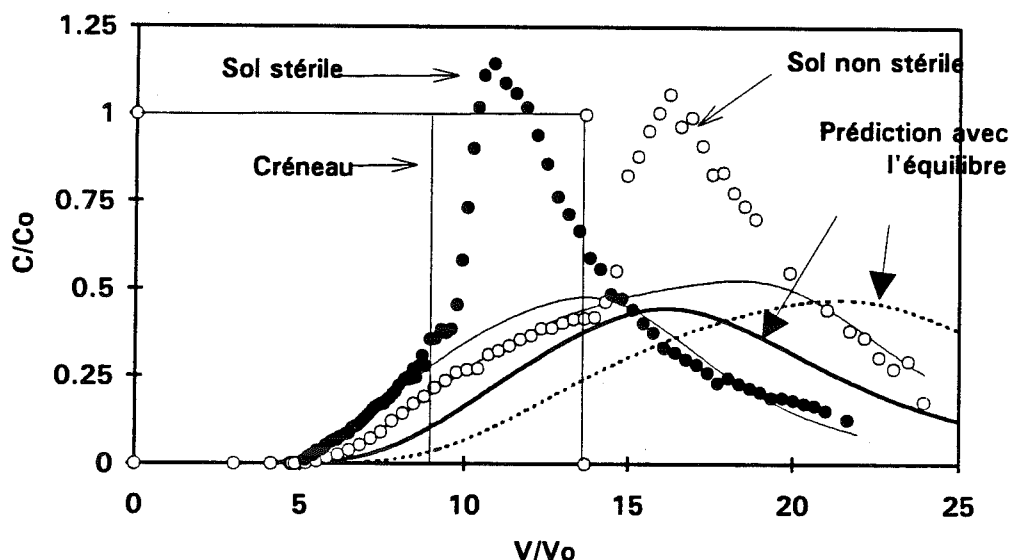


Figure V-38 : Courbes de restitution du PCP dans le sol stérile et non stérile (colonnes L2 et L4)

	KCl (L1)	sol stérile (L4)	sol non stérile (L2)	prédiction en sol stérile	prédiction en sol non stérile
v (cm.h ⁻¹)	1,36	0,50	0,51	0,50	0,51
créneau	1,14	9,1	13,7	9,1	13,7
Péclet	13,5	10	10	10	10
R	1	11	12,5	15,5	18,2
β	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
ω	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ψ	2,72	0,4	0,4	0,4	0,4
D (cm ² .h ⁻¹)	2	0,8	0,96	0,8	0,96
K (cm ³ .g)	0	3,8	4,4	5,6	6,6
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,425	0,425	0,425	0,425	0,425
α (h ⁻¹)	0,015	0,007	0,006	0,007	0,006
μ_d (h ⁻¹)	0	0,011	0,01	0,011	0,01

Tableau V-12 : Ajustement des paramètres sur les courbes d'élution de PCP dans le sol stérile et non stérile (colonnes L2 et L4)

On observe également sur la courbe V-38 (comme pour le biofilm), l'apparition d'un pic de concentration ($C/C_0 > 1$), environ un volume de pore après l'arrêt de l'injection du PCP, suivi d'une longue trainée qui correspond à une restitution lente du soluté retenu dans l'eau immobile ou sur les surfaces solides.

On peut donc représenter ces courbes en deux parties distinctes, la première correspondant à la phase montante de la courbe, et la seconde, correspondant à l'effet de purge dû à l'injection de la solution du sol après la solution de PCP.

La première phase de la courbe peut être représentée de manière satisfaisante par le jeu de paramètres ajustés, mais il n'est pas possible de représenter le pic de concentration avec le modèle utilisé.

Les facteurs de retard calculés pour les deux sols sont assez proches et cohérents avec ceux déterminés en batch. Ceci montre que la stérilisation n'entraîne pas une variation importante de la réactivité du sol, comme nous avons pu le constater dans le chapitre II sur les isothermes d'adsorption (figure II-9). De plus, l'effet de purge qui se traduit par l'apparition des pics de concentration semble être du même ordre de

grandeur pour les deux sols, confirmant le peu d'effet de la stérilisation du sol sur les interactions avec le PCP.

V-3-2-2 Effet de la concentration en PCP

Nous avons également étudié l'effet de la concentration en PCP sur les courbes de restitution dans le sol non stérile, les résultats sont présentés figure V-39.

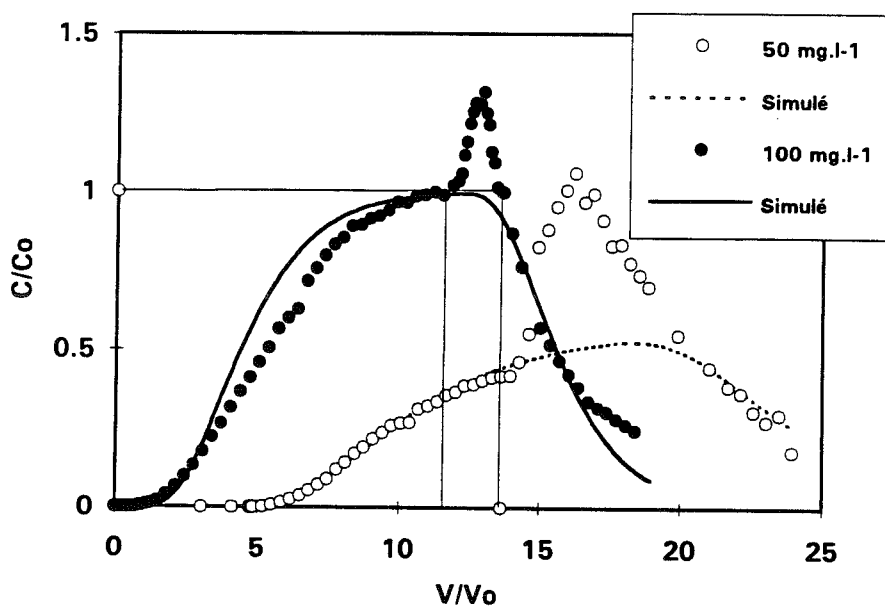


Figure V-39 : Effet de la concentration en PCP sur la courbe de restitution dans le sol non stérile (colonnes L1 et L2)

Contrairement à ce que l'on observe avec la matrice sableuse, non interactive, il semble que dans le sol, la concentration en PCP ait un effet significatif sur son comportement, en particulier sur le facteur de retard et sur la pente du front montant de la courbe.

L'ajustement des paramètres (tableau V-13) met en évidence une différence significative du facteur de retard et du nombre de Péclet entre les deux courbes. Cette différence implique que le coefficient de partage du soluté entre l'eau et le sol n'est pas une constante, l'isotherme d'adsorption du PCP sur le sol cultivé n'est donc pas linéaire à ces concentrations.

Ceci ne peut pas être confirmé par les essais obtenus en réacteur fermé (batch) car la concentration maximale atteinte à l'équilibre est de 15 mg.l⁻¹. Il serait donc intéressant de poursuivre ces isothermes d'adsorption jusqu'à des valeurs de concentration supérieure à 100 mg.l⁻¹ pour vérifier que la courbe de fixation devient bien non linéaire à de fortes concentrations.

Il faut noter toutefois, compte tenu du produit de solubilité du PCP, la difficulté à obtenir de fortes concentrations dans la solution servant à établir l'isotherme de fixation. Cette isotherme est difficile à obtenir dans la mesure où il est presque impossible de faire la différence entre la fixation et la précipitation. L'utilisation de solutions tampons peut éventuellement limiter la précipitation du PCP mais on n'est plus alors en conditions "naturelles".

PCP (mg.l ⁻¹)	50 (L2)	100 (L1)
v (cm.h ⁻¹)	0,51	1,36
créneau	13,7	11,4
Péclet	10	5
R	12,5	5
β	0,85	0,85
ω	0,5	0,5
Ψ	0,4	0
D (cm ² .h ⁻¹)	0,96	5,2
K (cm ³ .g ⁻¹)	4,4	1,5
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,425	0,425
α (h ⁻¹)	0,006	0,017
μ_d (h ⁻¹)	0,011	0

Tableau V-13 : Ajustement des paramètres sur les courbes de restitution du PCP à 50 et 100 mg.l⁻¹ dans le sol non stérile (colonnes L1 et L2)

Toutefois, les vitesses d'écoulement étant légèrement différentes, il est possible que le décalage entre les deux courbes soit en partie dû à un effet de vitesse qui, nous l'avons vu avec le sable, influe sur le coefficient de dispersion donc sur la pente du front montant de la courbe. Cela n'explique cependant pas la différence observée sur le facteur retard.

V-3-2-3 Effet de l'introduction de *R. chlorophenolicus* dans le sol

La population de *R. chlorophenolicus* a été introduite dans le sol selon les protocoles décrits au paragraphe IV-4-1. Nous avons utilisé deux méthodes d'inoculation : soit en tête de colonne avec un levain soit sur tout le profil de la colonne.

On peut observer, figure V-40, les courbes d'élution de PCP à 50 mg.l⁻¹ dans le sol stérile, ensemencé en tête de colonne et ensemencé sur tout le profil de la colonne.

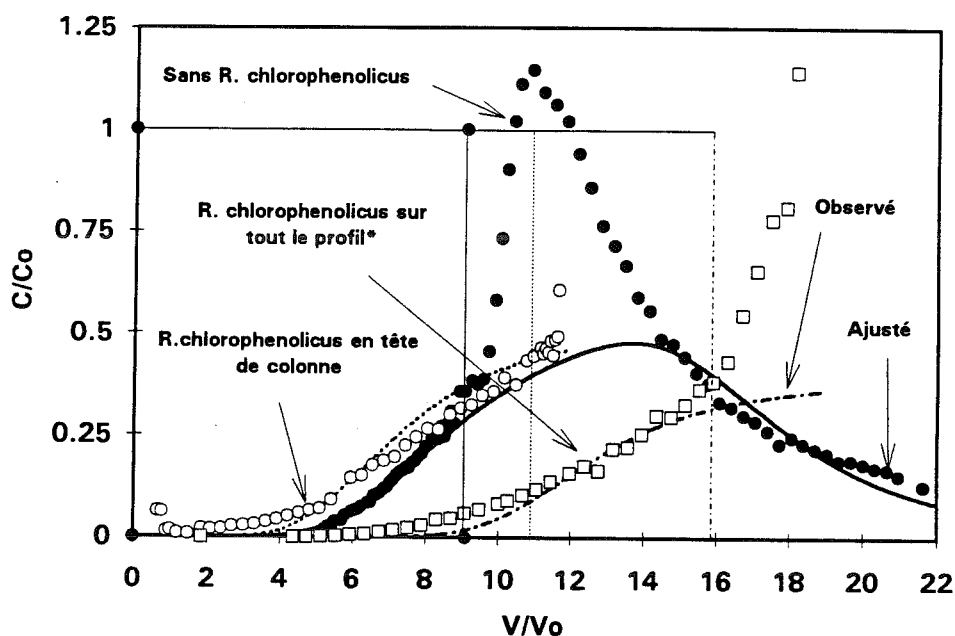


Figure V-40 : Courbes d'élution du PCP à 50 mg.l⁻¹ dans le sol stérile et inoculé en tête de colonne ou sur tout le profil avec *R. chlorophenolicus* (colonnes L4, L5 et L6)

Dans deux cas, les courbes sont incomplètes car les colonnes se sont colmatées avant la fin de l'expérimentation, ce qui rend impossible tout calcul de bilan de masse.

On observe cependant le même type de comportement du PCP : un front montant très dispersif suivi d'un début de pic de concentration observé précédemment. Un essai d'ajustement de paramètres à partir de ces courbes est présenté dans le tableau V-14 :

	Sol stérile (L4)	Sol non stérile inoculé en tête de colonne (L5)	Sol stérile inoculé sur tout le profil (L6)
v (cm.h ⁻¹)	0,51	0,52	0,51
créneau	9,1	11,9	15,8
Péclet	10	10	10
R	11	9	15
β	0,85	0,85	0,85
ω	0,5	0,5	0,5
Ψ	0,4	0,6	0,8
D (cm ² .h ⁻¹)	0,8	0,94	1,02
K (cm ² .g ⁻¹)	3,6	2,7	4,9
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,40	0,37	0,40
α (h ⁻¹)	0,0075	0,0067	0,006
μ_d (h ⁻¹)	0,013	0,017	0,02

Tableau V-14 : Ajustement des paramètres à partir des courbes de restitution du PCP à 50 mg.l⁻¹ dans le sol inoculé avec *R. chlorophenolicus* (colonnes L4, L5 et L6)

Les deux premières courbes ont été obtenues sur une même colonne de sol, en rajoutant simplement du sol inoculé avec *R. chlorophenolicus* en tête de colonne pour la deuxième courbe (sur une hauteur de 2 cm). Le fait d'avoir effectué deux essais sur une même colonne peut expliquer la valeur assez faible du paramètre R obtenue à partir de la deuxième courbe. Ce sol provient de trois microcosmes de sol stérile décrit dans le chapitre IV, correspondant à 12,6 g de sol sec avec une population de *R. chlorophenolicus* équilibrée à environ $5 \cdot 10^7$ cellules.g⁻¹. Il peut y avoir eu un effet de saturation des sites de fixation (le taux de récupération de PCP dans le premier essai n'étant que de 75%) favorisant ainsi une sortie plus rapide du soluté.

En ce qui concerne la courbe obtenue avec la colonne contenant *R. chlorophenolicus* sur tout le profil, on peut voir que le facteur de retard ainsi que le paramètre de disparition ajustés sont supérieurs à ceux obtenus avec la colonne de sol stérile.

Ceci tend donc à montrer que la présence des bactéries dans la colonne de sol stérile provoque un retard supplémentaire sur la courbe de sortie, et surtout des interactions irréversibles plus importantes entraînant une disparition plus élevée du soluté. Cette disparition peut être attribuée à de la fixation sur la biomasse ou à de la biodégradation.

Pour vérifier l'hypothèse de biodégradation, nous avons suivi en sortie de colonne l'évolution des concentrations en chlorures. Pour les deux premiers cas (sans bactéries ou bactéries en tête de colonne) nous n'avons observé aucune sortie d'ions chlorures, signe que le PCP n'est pas dégradé chimiquement ou trop peu pour que cela puisse être détecté. En revanche, sur l'essai de transfert dans la colonne de sol inoculé sur tout le profil, nous observons des concentrations en ions chlorures non négligeables (figure V-41) pouvant atteindre 25 mg.l^{-1} , ce qui correspond environ à 75% de la concentration maximale théorique si tout le PCP est dégradé (5 atomes de chlore par molécule de PCP). Les variations de la concentration en chlorures observées sont cependant difficiles à expliquer.

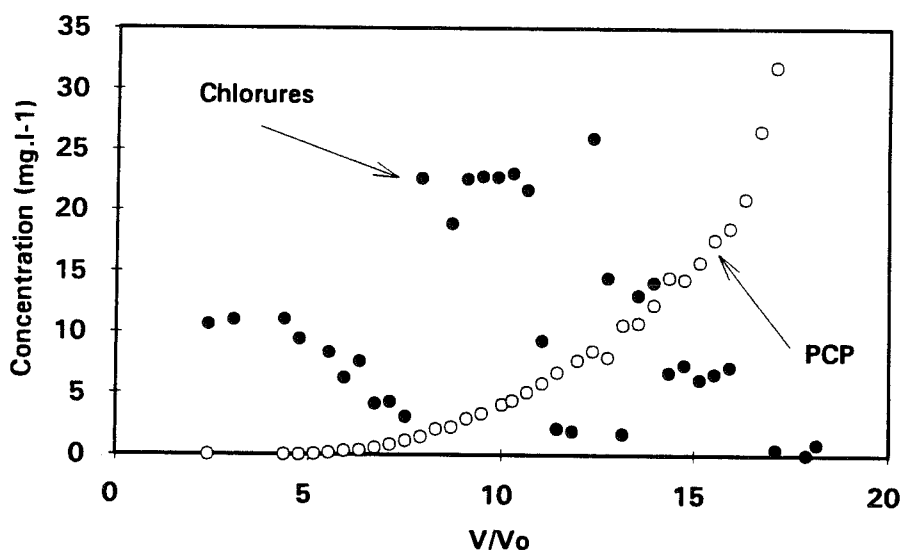


Figure V-41 : Suivi des chlorures au cours du transfert de PCP à 50 mg.l^{-1} dans le sol stérile inoculé avec *R. chlorophenolicus* (colonne L6)

Ce résultat ne peut être confirmé par le bilan de masse du PCP, cependant la diminution de la pente du front montant de la courbe par rapport à celle obtenue sur le sol stérile ainsi que l'augmentation du facteur de retard, nous laisse à penser qu'une partie du PCP est biodégradée (aucune autre source d'ions chlorures n'est présente).

L'apparition du pic de concentration, un volume de pore après la fin du créneau, montre qu'une quantité importante de PCP retenue dans le sol peut être libérée. Le PCP disparu n'est donc pas totalement dégradé. Il est cependant difficile de pouvoir déterminer la part de chaque phénomène car on ne peut savoir si la déchloration du PCP est totale ou partielle et on n'a pas retrouvé de produits de sa dégradation comme on s'y attendait.

Les résultats obtenus avec le sol non stérilisé sont présentés figure V-42.

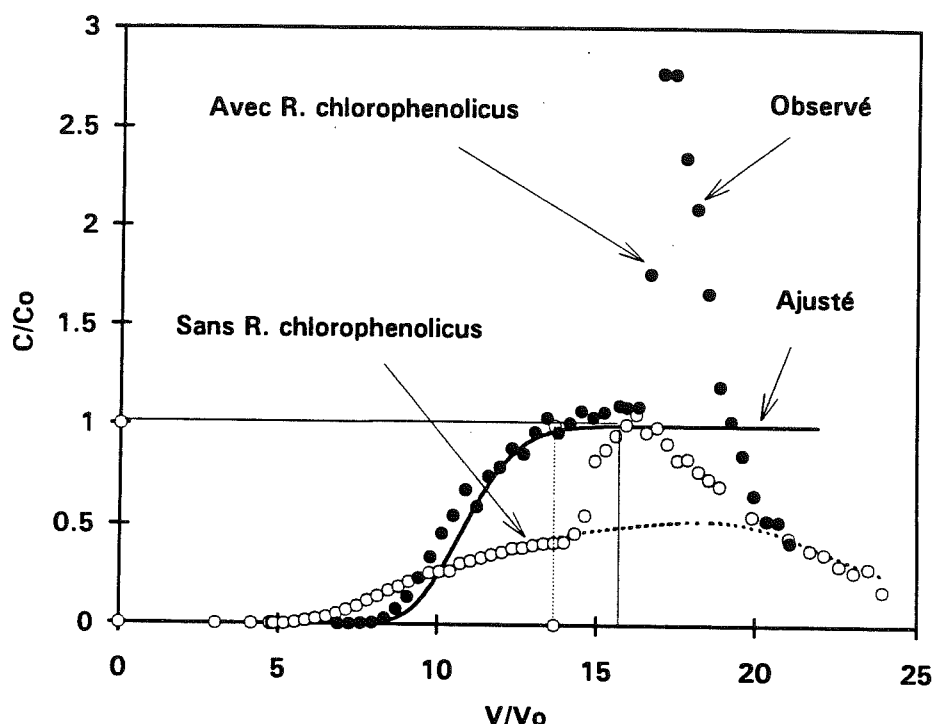


Figure V-42 : Courbes d'élution du PCP dans le sol non stérile inoculé ou non avec *R. chlorophenolicus* (colonnes L2 et L3)

L'ajustement des paramètres relatifs à ces courbes est présenté dans le tableau V-15.

Le taux de récupération du PCP jusqu'à 22 volumes de pore (fin des analyses de PCP) est de 80%, valeur supérieure à celle obtenue dans le sol non inoculé par *R. chlorophenolicus* (65%). Ce taux de récupération semble être réhaussé par le pic de concentration qui atteint presque $C/Co = 3$.

	Sans R. <i>chlorophenolicus</i> (L2)	Avec R. <i>chlorophenolicus</i> (L3)
v (cm.h ⁻¹)	0,51	0,65
créneau	13,5	15,8
Péclet	10	100
R	12,5	11
β	0,85	0,85
ω	0,5	10
Ψ	0,4	0
D (cm ² .h ⁻¹)	0,94	0,12
K (cm ² .g ⁻¹)	4,2	3,74
θ_m (cm ³ .cm ⁻³)	0,408	0,416
α (h ⁻¹)	0,0065	1,68
μ_d (h ⁻¹)	0,011	0

Tableau V-15 : Ajustement des paramètres sur les courbes d'élution du PCP à 50 mg dans le sol non stérile (L2) et dans le sol non stérile ensemencé par *R. chlorophenolicus* (L3)

L'introduction de cellules bactériennes dans le sol non stérilisé semble donc favoriser le transport du PCP, ce qui se traduit sur la courbe de restitution par un front montant beaucoup plus compressif, par la diminution du facteur de retard, par l'augmentation de la hauteur du pic de concentration qui est beaucoup plus important que celui obtenu avec le sol sans non ensemencé.

L'ajustement des paramètres sur la courbe de restitution du PCP dans le sol non stérile ensemencé par *R. chlorophenolicus* ne peut être effectué en utilisant les paramètres hydrodynamiques calculés pour le traceur. En particulier les coefficients de dispersion et d'échange entre les deux fractions d'eau sont nettement modifiés. Les résultats obtenus au paragraphe IV-2-2 montrent que le niveau de population de *R. chlorophenolicus* est sensiblement le même en colonnes de sol stérile et non stérile.

Le suivi des ions chlorures en sortie de colonne est présenté figure V-43.

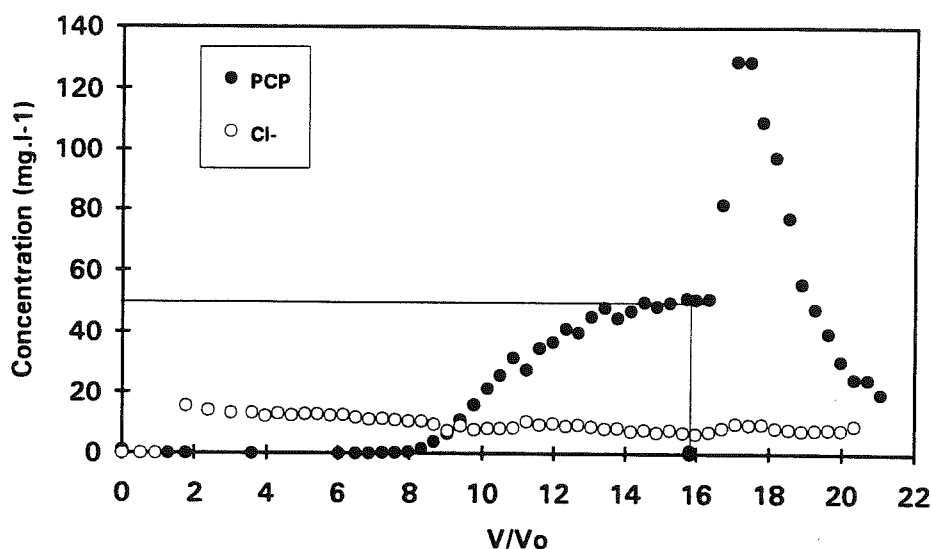


Figure V-43 : Suivi des chlorures au cours du transfert de PCP à 50 mg.l⁻¹ dans le sol non stérile inoculé avec *R. chlorophenolicus* (colonne L3)

On peut observer que la concentration en ions chlorures est relativement élevée et qu'elle diminue progressivement d'environ 18 à 10 mg.l⁻¹ au cours du transfert de PCP. La présence d'ions chlorures en sortie de colonne montre que le PCP est biodégradé.

La masse totale de chlorures éluée, en considérant que la déchloration du PCP est complète, correspond approximativement à une dégradation de 5,2 mg de PCP soit 13% de la quantité introduite, soit 2/3 du PCP disparu.

V-3-3 Discussion

L'analyse des courbes de restitution du traceur de l'écoulement fait ressortir des différences importantes par rapport aux essais relatifs au sable. Ces différences sont dues essentiellement à l'effet dispersif du sol qui tend à applatir et à étaler les courbes de restitution, ainsi qu'à sa structuration en agrégat qui entraîne la présence d'une porosité intraagrégat où l'eau est piégée donc immobile (responsable de la dissymétrie de ces courbes).

L'ajustement des paramètres a permis de montrer que l'ion chlorure est un bon traceur de l'écoulement dans le sol ($R = 1$ et $\mu_d = 0$) et que la taille du créneau d'injection n'entraîne pas de différences significatives au niveau de l'ajustement des paramètres.

Les résultats obtenus avec le PCP montrent que ce produit se comporte de manière semblable dans le sol stérilisé et dans le sol non stérile, ce qui confirme que le mode de stérilisation choisi n'affecte pas de manière importante la réactivité physico-chimique du sol.

Les courbes de réponse obtenues pour le PCP se caractérisent par deux parties distinctes correspondantes à des interactions et biodégradation (front montant de la courbe et palier) et à un entraînement particulier (pic de concentration observé après l'arrêt de l'injection du PCP).

L'ajustement des paramètres permet de représenter correctement la première partie de ces courbes mais pas la deuxième, qui correspond à une variation des équilibres géochimiques dans le sol, que le modèle utilisé ne prend pas en compte.

On retrouve le même type de phénomène qui a été observé avec le bioréacteur, à la différence qu'ici le pic de concentration en PCP ne peut être attribué au lessivage de cellules bactériennes car le sol stérilisé induit le même comportement que le sol non stérile.

Nous avons alors supposé que le PCP pouvait être entraîné en masse lors de la purge de la colonne, fixé sur des colloïdes du sol. En effet, ceux-ci sont apparemment lessivés en même temps que le PCP car on a observé que les solutions en sortie de colonne changent de couleur et deviennent plus chargées en particules fines, environ un volume de pore après l'arrêt de l'injection du PCP.

Nous avons alors fait effectuer sur les solutions récoltées en sortie de colonne, des analyses élémentaires par ICP (Inductive Couple Plasma spectrometry au SCA du CNRS) de silice et d'aluminium (colloïdes argileux) et de soufre et de potassium (présents dans la solution de PCP).

Les résultats ainsi obtenus sont présentés figure V-44 où l'on peut observer l'augmentation significative des concentrations en Si et Al en même temps que le pic de concentration en PCP et en phase avec la chute des concentrations en S et K.

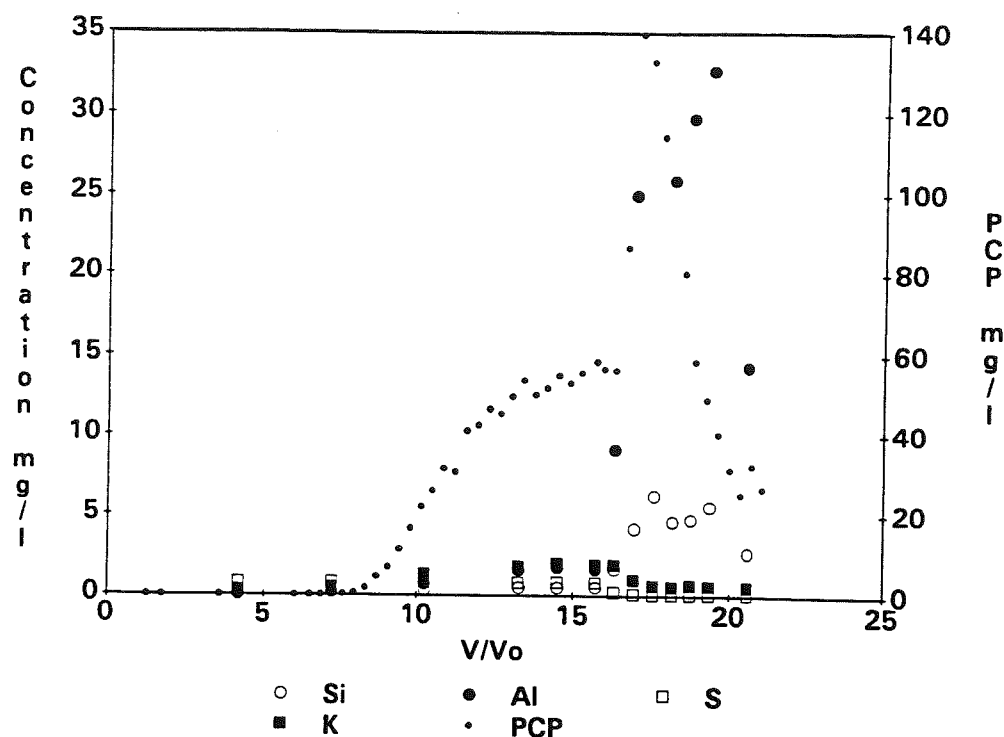


Figure V-44 : Suivi par analyse élémentaire des concentrations en Silice, Aluminium, Soufre et Potassium au cours du transfert de PCP dans le sol non stérile (colonne L3)

Ceci confirme donc la corrélation existant entre le pic de concentration en PCP et le pic de concentration en colloïdes argileux, lui même corrélé à la chute de concentration en S et K issus de la solution de PCP.

Le lessivage observé peut donc s'expliquer par une destabilisation des colloïdes argileux et éventuellement de matière organique (ils n'ont pas été recherchés) par la chute de la force ionique.

Le phénomène de destabilisation des colloïdes par la force ionique est connu (Sposito 1989, Iwata et al. 1988) et repose sur la variation de la concentration critique de coagulation (c.c.c.) (floculation) des colloïdes qui dépend de la force ionique (Frenkel et al. 1992).

Le transport de solutés (pesticides, métaux...) fixés sur des colloïdes de matière organique (qui peuvent être des cellules bactériennes) a déjà été observé par certains auteurs (Sposito 1989, Barriuso 1993, Madhum et al. 1986, Ballard 1971, Jardine et al. 1989) et est connu sous le nom de transport particulaire qui représente la forme majoritaire de transport des

pesticides par ruissellement à la surface des sols (Munoz 1992, Wauchope 1987, Mc Carthy & Zachara 1989).

Les résultats observés avec les colonnes de sol ensemencés par *R. chlorophenolicus* montrent que les phénomènes de transport du PCP sur les colloïdes argileux et sur les cellules bactériennes peuvent survenir simultanément (augmentation du pic de concentration en présence de cellules).

Les différences observées entre les courbes obtenues dans le sol stérile et dans le sol non stérile ne peuvent s'expliquer que par l'effet de la microflore indigène du sol. En effet, bien que le niveau de population de *R. chlorophenolicus* soit le même dans les deux sols (figures IV-27 et IV-28), il est probable que la localisation des cellules soit différente.

Dans le sol non stérile, la population de *R. chlorophenolicus* est confrontée aux phénomènes de prédation et de compétition pour les substrats et pour la colonisation des microniches favorables à son développement. Les cellules restent donc à l'extérieur des microagrégats et sont plus facilement en contact avec l'eau de percolation, donc avec le PCP.

Le contact cellules-PCP est ainsi facilité ainsi que le lessivage cellulaire, on peut alors supposer que la fixation rapide du PCP s'accompagne d'un lessivage cellulaire favorisant le transport du polluant. Ceci pourrait expliquer la diminution du facteur de retard observé par rapport au sol non ensemencé ainsi que la différence de hauteur du pic de concentration.

Dans le sol stérilisé, par contre, les cellules introduites ne sont pas limitées dans la colonisation des microagrégats. On peut donc supposer que celle-ci a eu le temps de s'effectuer, d'autant plus que l'essai de transfert du PCP n'a eu lieu que 20 jours après l'inoculation des bactéries.

Par conséquent, les cellules se trouvant alors partiellement en position intra agrégat, il est probable que le comportement du PCP ait été moins affecté par le lessivage cellulaire.

Ceci montre qu'il faut être relativement prudent lors de la bioremédiation des sols par l'introduction de populations adaptées à la dégradation d'un pesticide donné, car si les cellules sont mobiles ou mobilisables, et si les temps de séjour ne sont pas suffisant pour permettre

la biodégradation, on peut assister à une augmentation de la pollution des eaux profondes.

Par ailleurs, les dosages de chlorures au cours des deux essais en sols stériles ensemencés par *R. chlorophenolicus*, ont montré que malgré la saturation en eau, le PCP pouvait être biodégradé. La dégradation ayant eu lieu en présence d'autres sources de carbone, on peut supposer que le PCP est dégradé par co-métabolisme.

Les essais de transfert de KCl et de PCP en colonnes de sol n'ont été effectués qu'en conditions de saturation en eau, essentiellement pour des problèmes expérimentaux. En effet, l'obtention de régimes d'écoulements d'eau en condition de saturation partielle nécessite d'imposer une succion en sortie de colonne qui n'est pas réalisable avec le matériel actuellement disponible au laboratoire.

Par ailleurs, l'évolution physique du sol dans les colonnes (lessivage, variation de densité sèche), est incompatible avec les contraintes imposées par la méthode de contrôle de teneur en eau par gammamétrie qui implique de travailler avec un milieu poreux indéformable.

Une phase de mise au point a débuté au laboratoire, où l'on a testé divers matériaux pour la consolidation du sol ainsi que d'autres techniques de préparation du PCP qui est sans doute à l'origine de la déstabilisation des particules et du colmatage des colonnes (variations de force ionique).

CONCLUSION

Le découplage des processus effectué avec les différents milieux poreux utilisés, associé à la modélisation mathématique permet de faire ressortir les principaux points à prendre en compte à l'avenir dans le cadre de la prédiction du comportement des pesticides dans les sols.

A l'aide du sable, nous avons pu montrer d'abord l'existence d'un effet de la vitesse d'écoulement. Cet effet ne peut être mis en évidence qu'en colonnes de laboratoire saturées en eau, car dans les sols naturels, la vitesse d'écoulement se fixe d'elle même suivant les propriétés hydrodynamiques du sol (relations $h(\theta)$ et $K(\theta)$). Pour obtenir des résultats transposables, il convient donc de se placer dans des conditions d'écoulement les plus réalistes possibles.

De plus, nous avons pu montrer l'importance de la teneur en eau sur le comportement des solutés dans les sols, et en particulier la teneur en eau immobile susceptible d'induire des retards dans le transfert des pesticides, ce que l'on observe surtout avec les sols structurés (forte teneur en eau immobile, même à saturation).

Par ailleurs, nous avons pu montrer l'effet prépondérant du pH sur le comportement de la molécule ionisable qu'est le PCP. En particulier l'effet joue sur son produit de solubilité qui détermine d'une part le taux de précipitation et d'autre part le taux de molécules non ionisées beaucoup plus interactives avec les matrices solides.

L'étude sur les bioréacteurs a permis de montrer l'importance de la prise en compte des paramètres biologiques, ne serait ce que la fixation sur la biomasse et la bioaccumulation.

Nous avons également mis en évidence la biodégradation du PCP dans un bioréacteur qui, bien qu'elle soit faible doit néanmoins être prise en compte car en conditions naturelles, les temps de séjour des solutés sont nettement plus longs que ceux obtenus dans nos essais, de même que les conditions d'aérations sont plus favorables.

Au cours de cette étude, nous avons également pu montrer la potentialité des cellules bactériennes à être déstabilisées et lessivées par des processus mécaniques ou chimiques qui sont par ailleurs assez courants dans les sols (fortes pluies, irrigations...). La prise en compte de ce risque ne doit pas être négligée lors de réintroductions de bactéries dans les sols, mêmes si celles ci sont apparemment peu mobiles (cf. IV-13-4-2).

Par ailleurs, nous avons pu observer des différences entre les courbes de restitution expérimentales et celles prédites à partir des paramètres à l'équilibre, significatives de l'existence de phénomènes cinétiques (transfert de masse entre fractions d'eau, mécanisme de fixation) limitant les interactions avec les matrices solides. Ces phénomènes cinétiques mettent en défaut les prédictions effectuées à partir d'un coefficient de distribution (K_d) obtenu à l'équilibre.

La prise en compte de la composante biologique des sols (microflore indigène et populations introduites) couplée à la connaissance des mécanismes de régulation des niveaux de populations microbiennes (prédation et compétition), permet d'expliquer les différences de comportement observées pour le PCP dans le sol stérile et non stérile ensemencés par *R. chlorophenolicus*.

Un phénomène important, que nous n'attendions pas, est le transport de pesticide fixé sur des particules colloïdales argileux ou organiques. Ce phénomène, que nous avons observé également avec les bioréacteurs, apparaît comme un processus important susceptible d'intervenir fréquemment dans les sols lessivés (la plupart des sols cultivés). Ceci pourrait alors expliquer les fortes concentrations de pesticides observées annuellement au printemps et à l'automne, surtout après de fortes pluies.

Tout au long de ce travail, nous avons essayé de mener de manière simultanée les expériences et la modélisation, afin d'estimer les paramètres prépondérants pour chaque cas étudié. Le modèle de base utilisé, fait intervenir cinq paramètres adimensionnels qui sont complétés par un paramètre macroscopique permettant de prendre en compte la disparition des solutés, nous a permis d'ajuster de manière satisfaisante les courbes obtenues dans le sable saturé en eau avec le traceur et le PCP.

Les faibles interactions irréversibles ont pu être assez bien prises en compte grâce au terme de disparition introduit dans le modèle.

En considérant le partitionnement de l'eau en eau mobile et immobile, nous avons pu ajuster de manière satisfaisante, les résultats obtenus dans les colonnes de sable non saturé en eau aussi bien pour le KCl que pour le PCP. La prise en compte de la distribution de la teneur en eau mobile dans la colonne devrait permettre d'améliorer de façon sensible les ajustements obtenus à saturation partielle.

En ce qui concerne les essais effectués avec le bioréacteur, il a été possible de simuler correctement les résultats obtenus avec le traceur. L'utilisation des paramètres ajustés avec l'ion chlorure ne permet cependant pas de simuler de manière satisfaisante les courbes de restitution du PCP. En particulier, il est nécessaire de diminuer le paramètre β de 0,99 à 0,8, tout en ajustant un coefficient de dispersion très élevé. La prise en compte du seul paramètre μ_d ne permettant pas de représenter correctement les résultats, on peut dire que ce paramètre n'intègre pas tous les processus intervenant dans les bioréacteurs, et en particulier la très forte fixation sur la biomasse.

Les résultats concernant le transfert du pesticide dans le sol peuvent être représentés de manière satisfaisante avec les paramètres calés avec le traceur. Seul le pic de concentration en PCP observé en fin de créneau ne peut être représenté par le modèle.

Lorsque l'on introduit des bactéries dans le sol, le comportement du PCP est modifié. Dans le sol non stérile, le soluté est restitué plus rapidement et en plus grande quantité que dans le sol non inoculé. Les ajustements à l'oeil des courbes de restitution ne peuvent alors se faire sans modifier les paramètres hydrodynamiques déterminés avec le traceur de l'écoulement (Péclet et ω), ce qui signifie que le modèle ne prend pas en compte tous les mécanismes intervenant en présence de bactéries et en particulier les phénomènes de compétition et de prédation. Ces inhibitions ralentissent la colonisation des microagrégats du sol, favorisant ainsi le contact entre les cellules introduites et le PCP dans l'eau mobile. On n'observe pas ce comportement dans le sol stérile où la colonisation est plus rapide. Ceci favorise la biodégradation du PCP mais aussi le lessivage des cellules, qui peut s'avérer très important et que le modèle est incapable de prendre en compte.

Toutes ces observations nous ont conduit à préconiser pour l'avenir le développement d'un modèle capable de prendre en compte les équilibres géochimiques dans la solution du sol (force ionique, pH, dilution...) en plus des paramètres contenus dans le modèle que nous avons utilisés.

Par ailleurs, il faudra être en mesure de prévoir les instabilités physico-chimiques, responsables des phénomènes de lessivage des colloïdes ou de la précipitation des pesticides au contact des surfaces minérales.

Le paramètre de disparition utilisé dans cette étude (μ_d) devra également être affiné car il ne permet pas de représenter correctement les divers mécanismes ayant entraîné la consommation du PCP dans le sol. Une approche plus déterministe doit être suivie, en essayant de prendre en compte séparément la précipitation (liée au pH donc dépendant des équilibres géochimiques), la biodégradation ou encore la fixation irréversible (liaisons covalentes, résidus liés...).

Dans le cas des pesticides, les concentrations rencontrées dans l'environnement étant très faibles, la modélisation de la biodégradation pourra probablement être faite avec le modèle de Monod sans croissance (tableau III-7) car dans les sols, les xénobiotiques sont rarement à l'origine d'une synthèse de biomasse significative.

CONCLUSION GENERALE

Le devenir des produits chimiques dans les sols est influencé par des mécanismes très divers comme les interactions physico-chimiques, la dégradation chimique ou biologique, le transport par l'eau ou par des particules... Ces processus interviennent simultanément dans les milieux naturels et ne sont pas indépendants les uns des autres.

Par conséquent la compréhension du comportement des pesticides dans les sols implique une approche pluridisciplinaire permettant d'appréhender les différents mécanismes prépondérants de manière globale en identifiant au fur et à mesure les paramètres impliqués.

L'utilisation de colonnes de laboratoire, qui permettent de découpler les mécanismes en vue de leur identification en maîtrisant les conditions initiales et aux limites, nous a permis de déterminer les facteurs intervenant de manière prépondérante dans le comportement du Pentachlorophénol dans deux sols différents.

Parmi les facteurs contrôlant le comportement de la molécule organique dans la zone non saturée des sols, nous en avons retenu quatre.

= > **Le transport convectif** (écoulement de l'eau) est affecté par la nature et le degré d'humidité de la matrice solide utilisée : sable saturé en eau, sable non saturé et sol saturé.

Nous avons pu voir en particulier l'importance de la prise en compte de la teneur en eau immobile qui influe sur les temps de sortie et de séjour des solutés. Cet effet est amplifié par la structuration des sols en agrégats, responsables de l'immobilisation d'une quantité d'eau importante et d'une dispersion hydrodynamique élevée des solutés.

Nous avons montré également l'existence d'un effet de la vitesse d'écoulement et de la densité sèche apparente des sols sur le transport des pesticides. Toutefois, ce comportement concerne essentiellement des colonnes de sols saturés de laboratoire, car en conditions naturelles, les vitesses d'écoulement sont réglées par les caractéristiques des sols et les apports hydriques. Les variations de vitesses mettent néanmoins en évidence des effets cinétiques sur les solutés, les valeurs des vitesses et les densités sèches doivent être ajustées au laboratoire à des valeurs proches de celles de terrain pour conduire à des résultats transposables.

Une modélisation satisfaisante des résultats concernant le transport hydrique, caractérisé à l'aide d'un traceur de l'écoulement, a pu être effectuée en considérant la convection, la dispersion et le fractionnement

de l'eau en deux phases avec échange de matière entre l'eau mobile et l'eau immobile.

= > **Les interactions physico-chimiques**, sont faibles dans le sable de Fontainebleau mais pas inexistantes, contrairement à ce que l'on observe en batch. Ces interactions, qui ne semblent pas correspondre à des mécanismes spécifiques de fixation, pourraient s'expliquer par des réactions hétérogènes de changement de phase (précipitation-dissolution) et directement liés au pH dont dépend le produit de solubilité des molécules ionisables.

Par ailleurs, nous avons pu voir l'importance de la fixation du PCP sur la matière organique des sols qui peut être à l'origine de la majorité des interactions de ce soluté avec les matrices solides.

Nous avons toutefois pu noter une grande différence de comportement de la molécule au contact de la matière organique du sol naturel utilisé et au contact de la biomasse cellulaire introduite dans le sable.

Cette différence peut s'exprimer en terme de coefficient de partage (Koc) : nous avons pu calculer, à partir des coefficients de partage sol/eau, un Koc de 2,8 pour le sol cultivé à un pH proche de 7 et un Koc moyen de 5 pour les bioréacteurs.

On peut donc en conclure que la nature et l'accessibilité de la matière organique au soluté influent très largement sur ce coefficient de partage, contrairement à ce qu'ont observé Koskinen et Harper (1990) en comparant plusieurs sols naturels (cf.II-2-4-4-a). Dans les bioréacteurs, les cellules bactériennes sont en position externe aux grains, donc faciles d'accès pour le polluant.

Une approche globale des phénomènes d'interaction par corrélations de type Koc ou Kow semble donc difficilement envisageable. Des essais spécifiques au couple molécule-support solide en écoulement, paraissent par conséquent indispensables et conduisent en tout cas à de meilleures prédictions.

Le modèle que nous avons utilisé permet de reproduire assez bien les résultats obtenus avec le pesticide que ce soit dans le sable (saturé ou non), dans les bioréacteurs ou dans le sol. Cependant, les paramètres ajustés ne correspondant pas à des réalités physiques, la robustesse du modèle peut être mise en doute.

= > La biodégradation, a pu être mise en évidence dans les systèmes batch liquides qui ont permis d'estimer les paramètres de dégradation intrinsèques à la souche bactérienne utilisée. On a également montré l'existence de nombreuses populations bactériennes dans les sols capables d'effectuer cette dégradation, même si les capacités de dégradation sont quelques fois instables. Nous avons également pu observer la dégradation du PCP en colonnes (bioréacteur) en stoppant l'écoulement, rendant ainsi compatibles les différents temps caractéristiques (de dégradation et de séjour). La biodégradation a également été mesurée dans le sol naturel stérilisé (ou non) après y avoir introduit la souche *R. chlorophenolicus*.

Nous avons pu voir que le processus de biodégradation des pesticides est influencé par de nombreux facteurs et en particulier par la pression partielle en oxygène (pour les bactéries aérobies), le temps de contact avec les cellules compétentes ou encore leur distribution dans les agrégats, elle même liée à des mécanismes de régulation de la dynamique des populations microbiennes comme la prédation ou la compétition entre espèces.

L'effet de tous ces mécanismes est représenté dans le modèle par un paramètre de disparition du polluant (μ_d) unique et constant.

Comme pour les interactions physico-chimiques, les résultats faisant intervenir la biodégradation peuvent être assez bien reproduits à l'aide du modèle mathématique. Les paramètres ajustés montrent cependant que la prédiction n'est pas suffisamment robuste car elle ne prend pas en compte tous les mécanismes impliqués, ou, à une plus grande échelle de temps, le phénomène d'adaptation responsable en particulier de la variation temporelle des vitesses de dégradation (donc de μ_d).

= > Le transport particulaire du pesticide fixé sur des colloïdes organiques ou minéraux, a été mis en évidence avec les bioréacteurs et avec le sol (effet de concentration en soluté ou effet mécanique).

Ce phénomène est connu dans les eaux superficielles (ruissellement, érosion) mais semble plus nouveau dans la zone non saturée des sols. Il est lié à la stabilité des colloïdes qui dépend de la nature et de la réactivité de la solution du sol. Lorsque celle ci subit des modifications de composition et/ou de concentration (fortes pluies), les colloïdes peuvent alors être dispersés et contribuer au transfert des pesticides fixés vers des zones plus profondes. Ceci pourrait expliquer, dans le cas de sols lessivés, l'arrivée

massive de "bouffées" de pesticides dans les nappes phréatiques à la suite de forts épisodes pluvieux.

Ce phénomène se traduit sur les courbes de restitution par l'apparition de pics de concentration de PCP pouvant atteindre des valeurs de $C/C_0 = 3$ dans un sol non stérile ensemencé par *R. chlorophenolicus*.

Le niveau de concentration atteint est apparemment lié à la variation de la force ionique de la solution du sol mais aussi à la présence de cellules bactériennes qui permettent de concentrer le pesticide avant de participer à son transport.

On peut donc supposer que l'utilisation de populations bactériennes pour réhabiliter des sols pollués, sans prendre en compte les phénomènes de régulation des populations microbiennes et de transport des cellules microbiennes peut conduire selon les conditions météorologiques, à une aggravation des problèmes de pollution des aquifères.

Le transport particulaire n'est pas pris en compte par le modèle mathématique utilisé dans ce travail.

Nous avons donc pu identifier au cours de cette étude les mécanismes prépondérants qui gouvernent le comportement des molécules polluantes ionisables dans les sols cultivés et dans certains cas, prédire les courbes de restitution.

Toutefois, pour améliorer la prédiction, il apparaît indispensable d'élaborer un modèle plus robuste. Pour cela, nous pouvons envisager plusieurs voies de recherche :

- en ce qui concerne la physico-chimie, il apparaît incontestable que d'autres variables doivent être calculées, en particulier le pH, le potentiel redox, la force ionique.... Il faut donc pouvoir disposer d'un modèle de calcul des concentrations des éléments chimiques majeurs de la solution du sol, donc se diriger plutôt vers un modèle incluant les équilibres géochimiques et les cinétiques des réactions limitantes.

- pour l'entraînement particulaire, il semble nécessaire de prendre en compte le couplage écoulement de la solution-stabilité des colloïdes (organiques ou minéraux) et des cellules bactériennes. Il faut donc se diriger vers un modèle qui prend en compte la distribution des

microorganismes dans les sols, c'est à dire les paramètres biotiques et abiotiques de l'environnement qui fixent l'activité microbienne.

- pour les paramètres biologiques, et en particulier la biodégradation des pesticides, il semble que le problème soit radicalement différent de la modélisation du transfert de l'azote dans les sols. Le fonctionnement métabolique des cellules microbiennes peut être perturbé par exemple par la toxicité des molécules xénobiotiques.

De plus, l'augmentation de biomasse due à l'utilisation de pesticides comme substrat semble pouvoir être négligée compte tenu de la prédominance du processus de cométabolisme en conditions naturelles qui ne conduit pas à l'utilisation directe d'énergie ou de carbone des pesticides.

Par ailleurs, il semble indispensable de prendre en compte l'évolution du nombre de cellules compétentes pour la dégradation d'un pesticide donné, donc le phénomène d'adaptation et de régulation des populations ainsi que leur distribution dans le sol.

En l'absence de dégradation chimique, nous avons vu que le PCP est partiellement métabolisé en conditions dynamiques par une population bactérienne compétente introduite.

La quantité de chlorure formée peut provenir soit d'une déchloration totale (13% des molécules seraient alors touchées), soit d'une monodéchloration (65% des molécules touchées), suivie d'une réaction des métabolites avec la matrice du sol. Seul un marquage isotopique (^{13}C ou ^{14}C) permettrait de lever l'ambiguïté en donnant la possibilité de localiser les éventuels résidus d'une déchloration partielle.

Il n'en reste pas moins que, étant donnés les risques de migration particulière du PCP adsorbé sur les argiles ou sur les corps microbiens, auxquels s'ajoute la faiblesse de la dégradation, les possibilités de bioremédiation dans ce sol sont difficilement envisageables à l'heure actuelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACEA M.J., C.R. MOORE AND M. ALEXANDER 1988.** Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 20, n°4, pp 509-515.
- ADAMSON A.W. 1990.** The solid-liquid interface adsorption from solution. In "Physical Chemistry of surfaces". 5th Ed. A.W. Adamson ed. Wiley Interscience public.
- ALARY J., BARDIN R., BENOIT GUYOD J.-L., BLAKE G., BOULE P., BOULARY M., BOUTONNET J.-C., CHALAMET A., GAUDET J.-P., ISNARD P., JOCTEUR-MONTROZIER L., LAMBERT S., MARTINS J., MERLIN G., MORVAN J., NOVY QUADRI M., SEIGLE-MURANDI F., THIEBAUD H. 1992.** Devenir des produits chimiques dans l'environnement. Mise au point d'une méthodologie transposable. Vol. II: Devenir dans les sols. Exemple du pentachlorophénol. Rhône-Poulenc Interservices, Rapport LTHE n° R92-007.
- ALEXANDER M. 1977.** Transformation of Hydrocarbons. In "Introduction to soil microbiology". Alexander M. ed, Wiley & sons. 467p.
- ALEXANDER M. 1980.** Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211 p132-136.
- AMATO N., and LADD J.N., 1988.** Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, (1) 107-115.
- ANGLEY J.T., M.L. BRUSSEAU, W.L. MILLER AND J.J. DELFINO 1992.** Nonequilibrium sorption and aerobic biodegradation of dissolved alkylbenzenes during transport in aquifer material : column experiments and evaluation of a coupled-process model. *Environ. Sci. Technol.* 26 : 1404-1410.
- APAJALAHTI J.H.A and SALKINOJA-SALONEN M.S 1986.** Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Appl. Microb. Biotech.* 25 : p. 62-67
- APAJALAHTI J.H.A. AND M.S. SALKINOJA-SALONEN 1987.** Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *J. of Bacterio.* 169 (2) : 675-681.
- APAJALAHTI J.M.A., KARPANOJA P. and SALINOJA-SALONEN M. 1986.** *R.chlorophenolicus*. sp nov., a chlorophenol mineralizing actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol* 36:246-251.
- ASHTON M. 1982.** Persistence and biodegradation of herbicides. In "Biodegradation of pesticides" F. Matsumura ed.
- AUDUS L.J. 1949.** Detoxification of 2,4 D in soil. *Plant and Soil.* 2 p31
- AUDUS L.J. 1951.** The biological detoxication of hormone herbicides in soil. *Plant and soil.* 3 : 170-192.
- BALLARD T.M. 1971.** Role of humic carrier substances in D.D.T. movement through Forest soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35 : 145-147.
- BANERJEE S. 1984.** Development of a general kinetic model for biodegradation. *Environn. Sci. Technol.*, 18, 416-422.
- BARBAULT R. 1981.** Ecologie des populations et des peuplements. Masson ed. Paris 200 p.
- BARNES C.J. 1989.** Solute and water movement in unsaturated soils. *Water Resour. Res.* 25. 1 p 38-42.
- BARRIUSO E., BAER U. and CALVET R. 1992.** Dissolved Organic Matter and Adsorption-desorption of Dimefuron, atrazine, and Carbetamide by Soils. *J. Environ. Qual.*, p. 359-367.

- BELKESSAM L.** 1993. Note d'avancement du contrat Elf-RP-MRT. (Thèse en cours à l'ENSC Rennes)
- BELLINI J.A.** 1992. Transport d'humidité en matériau poreux en présence d'un gradient de température. Caractérisation expérimentale d'un béton cellulaire. Thèse Doctorale à l'U. J. F. Grenoble I. 193 pages.
- BERTIN G.** 1989. L'immobilisation de l'atrazine par la matière organique des sol. Thèse INPL Nancy 103p.
- BIGGAR J. W. AND M.W. CHENG** 1973. Adsorption of picloram on Panoch, Ephrata and Palouse soils : A thermodynamic approach to the adsorption mechanism. Soil sci. Soc. Amer. Proc. Vol. 37 p 863-868.
- BIRKINSHAW** 1965. Chemical constituents of the fungal cells-2. Special chemical products. In "The Fungi". Ainsworth G.C. and Sussman A. (eds) Acad. Press London.
- BOAST C.W.** 1973. Modeling the movement of chemicals in soils by water. Soil Sci. 115 (3) 224-230.
- BOLLAG J.M. AND M.J. LOLL** 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. Experientia 39 : 1221-1231.
- BOLLAG J.M. AND S.Y. LIU** 1990. Biological transformation processes of pesticides. In "Pesticides in the soil environment : processes, impacts and modeling". H.H. Cheng (ed). Soil Sci. Soc. Am. Inc. Madison. USA.
- BOLLAG J.M., S.Y. LIU AND R.D. MINARD** 1980. Cross coupling of phenolic humus constituents and 2,4 dichlorophenol. Soil Sci. Soc. Am. J. 44 : 52-56.
- BOTTNER P.** 1985. Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with ^{14}C and ^{15}N -labelled plant material. Soil Biol. Biochem. 17 : 329-337.
- BOYD S.A. , M.D. MIKESELL and J.F. LEE** 1989. Reactions and Movement of organic chemicals in soils. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, SSSA Special Publication n° 22.
- BOYD S.A.** 1982. Adsorption of substituted phenols by soil. Soil Sci. 134.5 : p 377-343.
- BOYD S.A. AND M.M. MORTLAND** 1990. Enzyme interactions with clays and clay organic matter complexes. In "Soil Biochemistry" vol.6. J.M. Bollag and G. Stotzky (eds). M. Detter Inc. New York.
- BRIGGS G.** 1981. Theoretical and Experimental relationships between soil adsorption, Octonol-Water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the Parachor. J. Agric. Food Chem. 29,1050-1059.
- BROCK T.D.** 1984. The microbe in its environment. In "Biology of Microorganisms". Chapt. 8. 4th ed., T.D. Brock, D.W. Smith and M.T. Madigan (eds) PHI Inc. London.
- BROCKWAY D.L., P.D. SMITH AND F.E. STANCIL** 1984. Fate and effects of Pentachlorophenol in hard and soft-water microcosms. Chemosphere Vol. 13 (12): pp 1363-1377.
- BROOKS R.H. and COREY A.T.** 1964. Hydraulic properties of porous media. Hydrology paper 3. Colorado State University, Fort Collins.
- BRUBAKER G.R. AND J.H. EXNER** 1988. Bioremediation of chemical spills. In "Environmental Biotechnology. Reducing risks from environmental chemicals through biotechnology". Edited by G.S. Omenn. p. 163.
- BRUCKERT S.** 1979. Analyse des complexes organo-minéraux des sols. In "Pédologie, Constituants et propriétés du sol". Duchaufour P. ed. Masson Paris.

- BRUGGEMAN W.A.** 1982. Hydrophobic interactions in the environment. In "The handbook of environmental chemistry". 2 part. B
- BUFFLE J.A.E.** 1977. Les substances humiques et leur interaction avec les ions minéraux, T.S.M. L'Eau I, 3-10.
- BULL A.T., G. HOLT AND D.J. HARDMAN** 1988. Environmental pollution policies in light of biotechnological assessment : Organisation for economic cooperation, United Kingdom, and European Economic council perspectives. In "Environmental biotechnology Vol. 45". G.S. Omenn (ed.).
- BUMPUS J.A. and AUST S.D.** 1987. Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood roting fungus. ACS Symposium series. 338, 340-349.
- BURLAGE R.S., HOOPER S.W. and SAYLER G.S.** 1989. The TOL (PWWO) catabolic plasmid. Appl. Envir Microb. 55 (6), 1323-1328.
- CALVET R.** 1988. Evaluation des coefficients d'adsorption et prédiction de la mobilité des pesticides dans les sols. In "Methodological aspects of the study of pesticide behaviour in soil". INRA Versailles.
- CALVET R., TERCE M.** 1975. Solubilité de l'atrazine dans des gels de montmorillonite calcique. C.R. Acad. Sci. 281, Paris.
- CALVET R., TERCE M. and ARVIEU J.C.** 1980. Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants. Ann. Agron. 1980. 31.
- CAMERON D.R. and KLUTE A.** 1977. Convective-dispersive solute transport with a combined equilibrium and kinetic adsorption model. Water Resour. Res., Vol. 13, n°1, pp. 183-188.
- CAMPBELL J.R.** 1985. Prediction of aromatic solute partition coefficients using the UNIFAC group contribution model. Environ. Sci. Technol. 19 : 980-985.
- CASSE F., BOUCHER C., JULLIOT J.S. and DENARIE J.** 1979. Identification and characterisation of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. J.Gen. Microbiol. 113: 229-242.
- CHAKRABARTY A.M.** 1982. Genetic mechanisms in the dissimilation of chlorinated compounds. In "Biodegradation and detoxification of environmental pollutants" Chakrabarty AM ed. Acad. Press 225p.
- CHAKRABARTY A.M.** 1986. Microbial interactions with toxic elements in the environment. In : "The importance of chemical speciation in environmental processes". Bernhard M ed. Plenum Press. 128-139.
- CHAKRABARTY A.M., ROTHMEL R.K., and HAUGLAND R.A.** 1989. Natural and directed evolution : Microbial degradation of synthetic chlorinated compounds. Comm. 5th International symposium on Microbial Ecology, KYOTO, (in press).
- CHAPMAN P.J.** 1988. Constructing microbial strains for degradation of halogenated aromatic hydrocarbons. In "Environmental Biotechnology. Reducing risks from environmental chemicals through biotechnology". Edited by G.S. Omenn. p. 81.
- CHARAKLIS W.G.** 1980. Biofilm development and destruction. Final report, Electric Power Research Institute, n°RP 902-1, Palo Alto, California.
- CHATTERJEE D.K., J.J. KILBANE AND A.M. CHAKRABARTY** 1982. Biodegradation of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. 44 : 514-516.
- CHEN Y.M., ABRIOLA L.M., ALVAREZ J.J., ANID P.J. and VOGEL T.M.** 1992. Modeling transport and biodegradation of benzene and toluene in sand aquifer material :

- comparisons with experimental measurements. *Water Resour. Res.*, vol. 28 n°7, p 1833-1847.
- CHENU C.** 1993. Clay or sand-polysaccharide associations as models for the interface between microorganisms and soil : water related properties and microstructure. *Geoderma*. 56 : 143-156.
- CHIOU C.T., PETERS L.J. and FREED V.H.** 1979. Physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds. *Science*, Vol. 206, pp. 831-832.
- CHOI J. and AOMINE S.** 1974a. Adsorption of PCP by soils. *Sci. Plant Nutr.* 20 (2) 135-144.
- CHOI J. and AOMINE S.** 1974b. Mechanisms of PCP adsorption by soils. *Sci. Plant Nutr.* 20 (4) 371-382.
- CIRELLI D.P.** 1978. Patterns of PCP usage in the United States of America. In "PCP, chemistry, pharmacology and environmental toxicology". K.R. Rao ed. Plenum Press. 402p.
- CLEYET-MAREL J.C. AND D. CHESSEL** 1978. Méthode de dénombrement de *Rhizobium japonicum* par immunofluorescence. Analyse statistique des comptages. *Ann. Phytopathol.* 10 (2) : 219-231.
- COATS K.H. and SMITH B.D.** 1964. Dead end pore volume and dispersion in porous media. *Soc. Pet. Eng. J.*, 4, 73-84.
- COLLANDER** 1950. *R. Acta. Chem. Scand.* 4.1095-1098.
- COOK A.M. and FEWSON C.A.** 1972. Evidence for specific transport mechanisms for aromatic compounds in bacteria. *Biochem. and Biophys. Acta* 290 p384.
- COOK R.J., R.I. PAPPENDICK AND D.M. GRIFFIN** 1972. Growth of 2 Root-Rot fungi as affected by osmotic and matric water potentiel. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 36: 78-82.
- COSTE C.M., BASTIDE J. and BARRERE C.** 1984. Mécanismes de transformation de composés pesticides dans le sol. In "Qualité et conservation des sols : devenir de substances xénobiotiques dans le milieu". Ministère de l'environnement contrat n°84065.
- COULET P.** 1989. Cours de génie enzymatique. Maîtrise de Génie Biologique. Université LYON I.
- CROSBY D.G. and WONG A.** 1978. Photolysis of PCP in water. In "PCP, chemistry, pharmacology and environmental toxicology". Ranga Rao K. ed. Plenum Press.
- CROSBY D.G., BEYNOU K.I., GREVE P.A., KORTE F., STILL G.G. and VONK J.W.** 1981. Environmental Chemistry of pentachlorophenol. *Pure and Appl. Chem.*, Vol. 53, 1051-1080.
- CROZAT Y. and CLEYET-MAREL J.C.** 1984. Problèmes méthodologiques posés par l'extraction et la récupération des bactéries telluriques pour leur quantification en immunofluorescence. *Agron.*, 4, 603-606.
- CUNNINGHAM A.B., CHARACKLIS W.G., ABEDEEN F. AND D. CRAWFORD** 1991. Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 25, n°7.
- CURTIS G.P., REINHARD M. AND P.V. ROBERTS** 1986. Sorption of hydrophobic organic compounds by sediments. In "Geochemical processes at mineral surfaces". ACS Symposium Series n°323.
- DAGLEY F.** 1978. In "The bacteria". Vol. 6 Acad. Press .
- DAUGHTON C.G. AND D.P.H. HSIEH** 1977. *Appl. Environ. Microbiol.* 34 : 175-184.

- DAVEY R.B. AND D.C. REANNEY 1980.** Extrachromosomal genetic elements and the adaptative evolution of bacteria. In "Evolutionary Biology". Edited by M.K. Hecht, W.C. Steere and B.P. Wallace, New York. Vol. 13, pp 113-147.
- DE WEERD K.A. AND J.M. SUFLITA 1990.** Anaerobic Aryl Reductive Dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (10) p 2990-3005.
- DI RUGGIERO J. 1989.** Ecologie et physiologie des bactéries réduisant le manganèse, exemple de la nappe alluviale d'Avignon (Vaucluse). Thèse UCB LYON I 150 p.
- DOMMERGUES Y. AND F. MANGENOT 1970.** Distribution des microorganismes et des enzymes. In "Ecologie microbienne du sol. Dommergues Y. and Mangenot F. (eds) Masson Paris.
- DORIOZ J.M. AND M. ROBERT 1982.** Etude expérimentale de l'interaction entre champignon et argile : conséquences sur la microstructure des sols. *CR. Acad. Sc. Paris T.* 295 série II, 511-516.
- DORIOZ J.M., M. ROBERT AND C. CHENU 1993.** The role of roots, fungi and bacteria on clay particle organisation. An experimental approach. *Geoderma* 56 : 179-194.
- DUCHAUFOR PH. 1991.** Pédologie, sol, végétation, environnement. 3ème édition. Edited by Masson, Paris, 289 pages.
- DUDMAN W.F. 1977.** The role of surface polysaccharides in natural environments. In "Surface carbohydrates of the prokaryotic cell Acad. Press. London.
- ECKARDT T. 1978.** A rapid method for the identification of ADN plasmids in bacteria. *Plasmid* 1, 584-588.
- EDGEHILL R.U. AND R.K. FINN 1983.** Microbial treatment of soil to remove PCP. *AEM* 45 (3) 1122-1125.
- FABRE B. 1990.** Influence de la nature des sols et de la matière organique sur l'adsorption des pesticides. Conséquences pour la pollution des nappes souterraines. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Poitiers. p124.
- FATHEPURE B.Z. AND T.M. VOGEL 1991.** Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two stage biofilm reactor. *App. Environ. Microbiol.* 57 (12) : 3418-3422.
- FEIND D., ZIERIS F.J. AND W. HUBER 1988.** Effects of sodium Pentachlorophenate on the ecology of a Freshwater Model Ecosystem. *Environ. Pollut.* 50 : 211-223.
- FILIP Z. AND T. HATTORI 1984.** Utilisation of substrates and transformation of solid substrates. In "Microbial adhesion and aggregation". K.C. Marschal (ed). Springe Verlag Berlin.
- FLAIG W., BEUTELSPACHER H. and RIETZ E. 1975.** Chemical composition and physical properties of humic substances. In "Soil components. Vol.1: Organic components". J.E. GIESEKING ed. Springer Verlag, Berlin.
- FOCHT D.D. 1988.** Performance of biodegradative microorganisms in soil: xenobiotic chemicals as unexploited metabolic niches. In "Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology". Omenn GS ed. Plenum Press.
- FOSTER R.C. 1988.** Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils.* 6 : 189-203.

- FOSTER R.C., ROVIRA A.D. AND T.W. COCK 1983.** Ultrastructure of the root-soil interface. The Amer. Phytopat. Soc. (ED.), St Paul, Minnesota, USA.
- FOURNIER J.C. 1989.** Aspects du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol. Thèse Université de Perpignan, 502 pages
- FRANTZ B. 1986.** The Bacteria . Vol. 10. SOKATCH J.R., L.N. ORNSTON eds. Acad. Press.
- FRENKEL H., M.V. FEY AND G.J. LEVY 1992.** Organic and inorganic anion effects on reference and soil Clay Critical Flocculation concentration. Soil Sci. Soc. Am. J. 56 : 1762-1766.
- FRICK T.D., R.L. CRAWFORD, M. MARTINSON, T. CHRESAND AND G. BATESON 1988.** Microbiological cleanup of groundwater contaminated by pentachlorophenol. In "Environmental Biotechnology. Reducing risks from environmental chemicals through biotechnology". Edited by G.S. Omenn. p. 173.
- FRIED J.J. AND M.A. COMBARNOUS 1971.** Dispersion in porous media. Advances in Hydroscience 7 : 169-282.
- GALVEZ L. 1990.** Devenir des micropolluants dans les sols : étude du cas particulier du pentachlorophénol. Rapport du Laboratoire de Chimie des Nuisances et Génie de l'Environnement, ENSC Rennes.
- GAMMACK S.M., E. PATERSON, J.S. KENYS, M.S. GRESSER AND K. KILLHAM 1992.** Factors affecting the movement of microorganisms in soils. In "Soil Biochemistry Vol. 7". G. Stotzky and J.M. Bollag (eds) M. Dekker Inc. New York.
- GAUDET J.P. 1990.** Transferts d'eau et de solutés en colonne de laboratoire et sur le terrain. XX Congrès du Groupe français des Pesticides, Lépin le Lac.
- GAUDET J.P. and VAUCLIN M. 1987.** Transport de l'eau et de substances chimiques dans les milieux partiellement saturés : la colonne et le milieu naturel. Colloque Intern. CNRS, Nancy.
- GAUDET J.-P. 1978.** Transferts d'eau et de soluté dans les sols non saturés. Mesures et simulation. Thèse Docteur d'Etat Es-Sciences Physiques, UJF-INP Grenoble.
- GAUDET J.P., JEGAT H., VACHAUD G. and WIERENGA P.J. 1977.** Solute transfer, with exchange between mobile and stagnant water through unsaturated sand. Soil Sci. Soc. Am. J. 41 (4), 665-671.
- GEYER H., KRAUS A.J., KLEIN W., RICHTER E. and KORTE F. 1980.** Relationship between aqs and BCF in rats" 9, 277-291.
- GEYER H., POLITZKI G. and FREITAG D. 1984.** Relationship between Kow and BCF by alga chlorella. Chemosphere, 9, 277-291.
- GILE J.D. and GILLET J.W. 1979.** Fate of fungicides in a terrestrial ecosystem. J. Agric. Food Chem., 27, 1159-1164.
- GIVAUDAN A. 1990.** Caractérisation de plasmides chez *Azospirillum lipoferum*, bactérie associée aux racines de graminées. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard LYON I. 129 pages.
- GOERLITZ D.F., D.E. TROUTMAN, E.M. GODSY AND B.J. FRANKS 1985.** Migration of wood-preserving chemicals in contaminated groundwater in a sand aquifer at pensacola, florida. Environ. Sci. Technol., 19 (10) : 955-961.
- GOTTSCHALK G. 1988.** Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York, 2nd ed., Ch. 2, p. 12.

- GRAHAM-BRYCE 1980.** In "Physical principles of pesticide behaviour: The dynamics of applied pesticides in the local environment in relation to biological response". Hartley G.S. ed. Acad. Press. 518p.
- GREEN R.E. AND S.W. KARICKHOFF 1990.** Sorption estimates for modeling. In "Pesticides in the soil Environment : Processes, Impacts and Modeling. H.H. Cheng ed. Soil Sci. Soc. Am. Book Series USA.
- GRIFFIN D.M. 1981.** Water potentials as a selective factor in the microbial ecology of soils. In "Water potential relations in soils microbiology". Soil Sci. Soc. Amer. Publ. n°9. Parr J.F., R.I. Papendick and R.E. Wildung (eds).
- GROSS F. 1992.** Caractérisation des transferts hydrodynamiques et des interactions physico-chimiques du pentachlorophénol en sols saturés. Rapport de stage effectué au LTHE.
- GRUNDMANN G.L., ROLSTON D.E. AND R.G. KACHANOSKI 1988.** Field soil properties influencing the variability of denitrification gas fluxes. Soil Sci. Soc. Am. J. 52 : 1351-1355.
- GUEZ P. 1990.** Distribution des microorganismes dans 2 types de sols : influence de leur localisation sur leurs contacts avec un herbicide (Atrazine). DEA. d'Ecologie Microbienne. Université LYON I.
- HAGGBLOM M.M., JANKE D. and SALKINOJA-SALONEN M. 1989.** Transformation of chlorinated phenolic compounds in the genus *Rhodococcus*. Microb. Ecol. vol 18, p 147-159.
- HAGGBLOM M.M., JANKE D. and SALKINOJA-SALONEN M. 1989.** Transformation of chlorinated phenolic compounds in the genus *Rhodococcus*. Microb. Ecol. vol 18, p 147-159.
- HANSCH C., J.E. QUINLAN AND G.L. LAWRENCE 1968.** J. Org. Chem. 33 : 347-350.
- HARDMAN D.J. 1987.** Microbial control of environmental pollution : the use of genetic techniques to engineer organisms with novel catalytic capabilities. In "Environmental Biotechnology". C.F. Forster and D.A.J. Wase (eds). p. 295-317.
- HARDMAN DJ 1981.** Microbial control of environmental pollution. In "Environmental Biotechnology", C.Forster ed. Acad Press.
- HARDY K. 1984.** Catabolic plasmids. In " Bacterial plasmids". HARDY.K. ed
- HARRIS R.F. 1981.** Effect of water potential on microbial growth and activity. In "Water potential relations in soil microbiology". Soil Sci. Soc. Amer. Pub. n°9.Parr J.F., R.I. Papendick and R.E. Wildung (eds).
- HARTMANN J., W. REINEKE AND H.J. KNACKMUSS 1979.** Metabolism of 3-chloro, 4-chloro and 3,5 dichlorobenzoate by a Pseudomonad. Appl. Environ. Microbiol. 37 (3) : 421-428.
- HATTORI T. AND R. HATTORI 1976.** The physical environment in soil microbiology an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. Crit. Rev. Microbiol. 4 : 423-461.
- HATTORI T. 1988.** Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. Rep. Inst. Agr. Res. Tohoku. Univ. 37 : 23-36.
- HATTORI R. AND T. HATTORI 1993.** Soil aggregates as microcosms of bacteria protozoa biota. Geoderma, 56 : 493-501.
- HAYES M.H.B. 1970.** Adsorption of triazine herbicides on soil organic matter, including a short review on soil organic matter chemistry. Residue Rev. 31 : 131-174.

- HAYES M.H.B., M.E. PICK AND B.A. TOMS 1972.** Application of micro-calorimetry to the study of interactions between organic chemicals and soil constituents. *Sci. Tools* 19 : 9-12.
- HEIJNEN C.E., C. CHENU AND M. ROBERT 1993.** Micro-morphological studies on clay-amended and unamended loamy sand, relating survival of introduced bacteria and soil structure. *Geoderma* 56 : 195-207.
- HENSCHKE R.B. AND F.R.J. SCHMIDT 1989.** Survival, distribution, and transfer of bacteria in a compact soil microcosm system. *Biol. Fertil. soils* 8 : 19-24.
- HERBERT R.A., 1982.** Procedures for the isolation, cultivation and identification of bacteria. In "Experimental microbial ecology". Burns R.G., Slater J.H. Eds. Blackwell Scientific Publication, 683 p.
- HILLEL D 1980.** Fundamentals of soil physics. Academic Press. Inc. London.
- HOPPE H.G. 1984.** Attachment of bacteria : advantage or disadvantage for survival in the aquatic environment. In "Microbial adhesion and aggregation". K.C. Marshall (ed) Springer-Verlag Berlin.
- HORVATH RS 1972.** Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacter. Rev.*
- HUANG PM 1980,** Adsorption processes in soil. In "The handbook of environmental chemistry: Reactions and processes" Vol.2 part. A
- HUANG P.M. 1990.** Role of soil minerals in transformations of naturels organics and xenobiotics in soil. In "Soil Biochemistry" Vol. 6. J.M. Bollag and G. Stotzky eds. M. Dekker Inc. New York.
- HUYSMAN F. AND W. VERSTRAETE 1993.** Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns : Influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biol. Biochem.* 25 (1) : 83-90.
- IWATA S., T. TABUCHI AND B.P. WARKENTIN 1988.** Soil-water interactions. Mechanisms and applications. M. Dekker (ed.) New York.
- JAFVERT C.T., J.C. WESTALL, E. GRIEDER AND P. SCHWARZENBACH 1990.** Distribution of hydrophobic Ionogenic organic compounds between octanol and water : organic acids. *Environ. Sci. Technol.* 24 : 1795-1803.
- JAMET P. AND D. HOYOUX-ROCHE 1990.** Influence du rapport sol-eau lors de l'étude quantitative de l'adsorption et de la désorption des pesticides. Methodological aspects of the study of the pesticide behaviour in soil. INRA Versailles, June 16-17.
- JARDINE P.M., N.L. WEBER AND J.F. MC CARTHY 1989.** Mechanisms of dissolved organic carbon adsorption on soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53 : 1378-1385.
- JENKINS T.F., D.C. LEGGETT, V. PARKER AND J.L. OLIPHANT 1985.** Toxic organics removal kinetics in overland flow land treatment. *Water Res.* 19 (6) : 707-718.
- JENKINSON D.S. AND J.N. LADD 1981.** Microbial biomass in soil. Measurement and turnover. In "Paul E.A., Ladd J.N. (eds). *Soil Biochemistry*. Vol. 5. Dekker New York. p. 415-471.
- JOCTEUR MONROZIER L. 1984.** Nature et evolution de l'azote organique dans les sols et les sédiments marins récents. Thèse d'Etat Univ. de Nancy I 176 p.
- JOCTEUR MONROZIER L., LADD J.N., FITZPATRICK R.E., FOSTER R.C. AND M. RANPACH 1991.** Components and microbial biomass content of size fractions from soils of contrasting agregation. *Geoderma* 49, 37-62.

- JOCTEUR MONROZIER L., P. GUEZ, A. CHALAMET, R. BARDIN, J. MARTINS AND J.P. GAUDET 1993.** Distribution of microorganisms and fate of xenobiotic molecules in unsaturated soil environments. *The J. of total Environ.* 136 : 121-133.
- JOSSERAND A. 1983.** Apport de l'immunofluorescence à l'étude écologique des nitrifiants. Thèse d'Etat, Université de Lyon I, 149 p.
- JURY W.A., FOCHT D.D. and FARMER W.J. 1987.** Evaluation of pesticide groundwater pollution potential from standard indices of soil-chemical adsorption and biodegradation. *J. Environ. Qual.* 16 (4) 422.
- KAAKE R.H., D.J. ROBERTS, T.O. STEVENS, R.L. CRAWFORD AND D.L. CRAWFORD 1992.** Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-Butyl-4,6-Dinitrophenol (Dinoseb). *App. Environ. Microbiol.* 58 (12) : 1683-1689.
- KARICKHOFF S., D.S. BROWN AND T.A. SCOTT 1979.** *Water Res.* 13 : 241-248.
- KARICKHOFF S.N. 1984.** Organic pollutant sorption in aquatic systems. *J. Hydraul. eng.* 110 : 707-735.
- KARNS J.S. 1989.** The molecular biology of pesticide degradation by soil bacteria. *Comm. International Symposium on Microbial Ecology*, 1989 Kyoto.
- KARNS J.S., MULDOON M.T. and MULBRY W.W. 1987.** Use of microorganisms and microbial systems in the degradation of pesticides. In "Biotechnology in agricultural chemistry". ACS Symposium series n° 334.
- KAWASAKI H., H. YAHARA AND K. TONOMURA 1981.** Isolation and characterization of plasmid pUO1 mediating dehalogenation of haloacetate and mercury resistance in *Moraxella* sp. *B. Agric. Biol. Chem.* 46 (6) : 1477-1481.
- KEARNEY P.C., E.A. WOOLSON, J.R. PLIMMER AND A.R. ISENSEE 1969.** Decontamination of pesticides in soil. *Residue Rev.* 29 : 137-149.
- KEARNEY P.C. and KELLOG S.T. 1985.** Microbial adaptation to pesticides. *Pure and Applied Chemistry*, 57 (2), 389-405.
- KENAGA E.E. and GORING C.A.J. 1979.** Relationship between aqs, Koc and BCF. *ASTM.STP*, 707, 78-115.
- KENGNI 1993.** Mesure *in-situ* des pertes d'eau et d'azote sous culture de maïs irriguée. Application à la Plaine de la Bièvre (Isère). Thèse Doctorale U.J.F. Grenoble I. 220 p.
- KILBERTUS G. 1980.** Etude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol. Leurs relations avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev. Eco. Biol. Sol.* 17 (4) : 543-557.
- KITUNEN V.H, VALO R.J. AND M.J. SALKINOJA-SALONEN 1987.** Contamination of soil around wood-preserving facilities by polychlorinated aromatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 21 n°1 p. 96-101.
- KNACKMUSS H.J. and BRILLON C. 1981.** Enrichment and isolation of Naphtalene sulfonic acid utilising *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microb.* 42 (1) 39-43.
- KONINGS W.N. AND H. VELDKAMP 1983.** Energy transduction and solute transport mechanisms in relation to environments occupied by microorganisms. In "Microbes in their natural environments". J.H. Slater, R. Whittenbury and J.W.T. Wimpenny (eds). Cambridge Univ. Press.
- KOSKINEN W.C. AND S.S. HARPER 1990.** The retention process : Mechanisms. In "Pesticides in the soil environment : Process, Impacts and Modeling. H.H. Cheng ed. Madison USA.
- KURTZ L.T. and MELSTED S.W. 1973.** Movement of chemicals in soils by water. *Soil Sci.* 115 (3) 231.

- KUWATSUKA S. and IGARASHI M.** 1975, Degradation of PCP in soils II Relationship between the degradation of PCP and the properties of soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 21 (4) 405-413
- LAMAR R.T., GLASER J.A. and KENT KIRB T.** 1990. Fate of PCP in sterile soils inoculated with the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol. Biochem.* 22 (4) 433.
- LAMAR R.T., M.J. LARSEN AND T.K. KIRK** 1990. Sensitivity to and degradation of PCP by *phanerochaete* Sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 2885-2889.
- LAMBERT S.M.** 1967. Functional relationship between sorption in soil and chemical structure. *J. Agric. Food. Chem.* 15 : 572-576.
- LAUDELOUT H. AND SCHWEICH D.** 1986. Les mécanismes d'interaction solide-liquide et leur modélisation : Applications aux études de migration en milieu aqueux. *DOC. TECH. de l'AIEA* 367.
- LE CHEVALIER M.W., C.D. CAWTHON AND R.G. LEE** 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31 : 2492-2499.
- LEE L.S., RAO P.S.C., NKEDI-KISSA P. and DELFINO J.J.** 1990. Influence of solvent and sorbent characteristics on distribution of pentachlorophenol in octanol-water and soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 654-661.
- LEE L.S. , RAO P.S.C AND M.L. BRUSSEAU** 1991. Nonequilibrium sorption and transport of neutral and ionised chlorophenols. *Environ. Sci. Technol.* 25, 722-729.
- LEUENBERGER C. and SCHWARZENBACH A.P.** 1984. Sorption of chlorinated phenols by natural sediments and aquifer materials". *Environ. Sci. Technol.*, 18, 9, 652-657.
- MACRINA F.L., D.J. KOPECKO, K.R. JONES, D.J. AYERS AND S.M. MC COWEN** 1978. A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain : Convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1, 417-420.
- MADHUM Y.A., J.L. YOUNG AND V.H. FREED** 1986. Binding of herbicides by water soluble organic materials from soil. *J. Environ. Qual.* 15 : 64-68.
- MADSEN E.L. AND M. ALEXANDER** 1982. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46 : 557-560.
- MARLOW H.J., K.L. DUSTON, M.R. WIESNER, M.B. TOMSON, J.T. WILSON AND C.H. WARD** 1991. Microbial transport through porous media : The effects of hydraulic conductivity and injection velocity. *J. of Ha. Mat.* 28 : 65-74.
- MARSHALL K.C.** 1986. Theory and practice in bacterial adhesion processes. In "Perspectives in microbial ecology". F. Megusar and M. Gautar (eds).
- MARTINS J., L. JOCTEUR MONROZIER, J.P. GAUDET and P. NORMAND** 1992. Aspects biologiques et physiques de la dégradation des pesticides chlorés dans le sol. 5e Entretiens du centre J. Cartier. Colloque n°17 : Réhabilitation des sols contaminés. 6-10 Octobre Montréal.
- MARTINS J., M. NOVY QUADRI, L. JOCTEUR MONROZIER AND J.P. GAUDET** 1992. Méthodologie d'étude du transfert d'un pesticide, le pentachlorophenol, dans des colonnes de sols partiellement saturés en eau : écoulement, interactions, biodégradation. XXIIe congrès du Groupe Français des Pesticides. 19-20 Mai Dijon.
- MARTINS J., NOVY QUADRI M., L. JOCTEUR MONROZIER, J.P. GAUDET** 1993. Transfer of a Pesticide (Pentachlorophenol) in Columns of soil with Interactions and Biodegradation : Experience and Modeling. Proc. of the IX^e Symposium Pesticide chemistry : mobility and biodegradation of xenobiotics. 11-13 octobre PIACENZA.

- MATSUMURA F.** 1982. Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight. In "Biodegradation of pesticides" F. Matsumura ed
- MC BRIDE M.B. and KUNG K.H.** 1991. Adsorption of phenol and substituted phenols by iron oxides. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 10, p 441-448.
- MC BRIDE, F.J. BROCKMAN, J.E. SZECSODY AND G.P. STREILE** 1992. Kinetics of quinoline biodegradation, sorption and desorption in a clay-coated model soil containing a quinoline-degrading bacterium. *J. of Contam. Hydrol.* 9 : 133-154.
- MC CALL P.J., SWANN R.L. AND D.A. LASKOWSKI** 1983. Partition models for equilibrium distribution of chemicals in environmental compartments. In "Fate of chemicals in the environment". ACS Symposium Series n°225.
- MC CARTHY J.F. AND J.M. ZACHARA** 1989. Subsurface transport of contaminants: role of mobile colloidal particles. *Environ. Sci. Technol.* 23 : 496-504.
- MC CARTY P.L.** 1988. Bioengineering issues related to *in situ* remediation of contaminated soils and groundwater. In "Environmental Biotechnology. Reducing risks from environmental chemicals through biotechnology". Edited by G.S. Omenn. p. 143.
- Mc CLURE N.C., J.C. FRY AND A.J. WEIGHTMAN** 1991. Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (2) : 366-373.
- MERMOUD A.** 1982. Contribution à l'étude des transferts simultanés d'eau et de soluté en milieu poreux. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- MIDDELDORP P.J.M., M. BRIGLIA AND M.S. SALKINOJA-SALONEN** 1990. Biodegradation of Pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Microb. Ecol.* 20 : 123-139.
- MIKESELL M.D. AND S.A. BOYD** 1985. Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T and pentachlorophenol in anaerobic sludges. *J. Environ. Qual.* 14 : 337-340.
- MIKESELL M.D. AND S.A. BOYD** 1986. Complete reductive dechlorination and mineralization of Pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *App. Environ. Microbiol.* 52 (4) : 861-865.
- MOHN W.W. AND J.M. TIEDJE** 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56 (3) : 482-507.
- MOORMAN T.** 1990. Adaptation of microorganisms in subsurface environments. A.C.S. Symposium Series n°426 K.D. Racke and J.R. Coats (eds).
- MOOS L.P. and KIRSCH E.J.** 1983. PCP biodegradation. I Aerobic. *Water Res.* 17 (11), 1575-1584.
- MUELLER J.G., P.D. MIDDAGH, S.E. LANTZ AND P.J. CHAPMAN** 1991. Biodegradation of creosote and Pentachlorophenol in contaminated groundwater : chemical and biological assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (5) : 1277-1285.
- MUNNECKE D.M., L.M. JOHNSON, H.W. TALBOT AND S. BARIK** 1982. Microbial metabolism and enzymology of selected pesticides. p. 1-32. In A.M. Chakrabarty (ed.) "Biodegradation and detoxification of environmental pollutants". CRC Press.
- MUNOZ J.F.** 1992 Méthodologie d'étude des produits phytosanitaires. Etude d'un bassin versant viticole : l'Ardière (Beaujolais). Mise au point de méthodes analytiques de pesticides. Thèse de l'UCB LYON I. 175 p.
- MUSY A. AND M. SOUTTER** 1991. Physique du sol. Presses polytechniques et universitaires Romandes.
- NIELSEN M.T. D.R. VAN GENUCHTEN AND J.W. BIGGAR** 1986. Water flow and solute transport processes in the unsaturated zone. *Water Resour. Res.* 22 (9) 89, 108.

- NIETFELD H., E. PRIESACK AND F. BEESE 1992. A model of solute transport and microbial growth in aggregates. *Mod. Geo-Biosphere Processes*, Vol 1, p. 1-12.
- NKEDI KIZZA P., P.S.C. RAO AND A.G. HORNSBY 1985. Influence of organic cosolvents on sorption of hydrophobic organic chemicals by soils. *Environ. Sci. Technol.* 19: 975-979.
- NOVY QUADRI M.G. 1993. Transferts de solutés dans les sols saturés et non saturés. Application au Pentachlorophenol. Thèse UJF Grenoble 204 p.
- OZAWA T. AND M. YAMAGUCHI 1986. Fractionation and estimation of particle-attached and unattached *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 911-914.
- PAPPENDICK R.I. AND G.S. CAMPBELL 1981. Theory and measurement of water potential. In "Water potential relations in soil microbiology". Soil Sci. Soc. Amer. Publ. n°9.
- PARKER J.C. and VAN GENUCHTEN M.Th. 1984. Determining transport parameters from laboratory and field tracer experiments. Bulletin 84-3, Virginia Agricultural Experiment Station.
- PAUL E.A. AND F.E. CLARK 1989. Soil microbiology and biochemistry Acad. Press. Inc. New York.
- PELMONT J. 1993. Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. Presses Univ. Grenoble.
- PFANNKUCH H.O. 1962. Contribution à l'étude des déplacements de fluides miscibles dans un milieu poreux. Thèse de Docteur Ingénieur, Université de Paris.
- PIGNATTELLO J.J., L.A.K. JOHNSON, M.M. MARTINSON, R.E. CARLSON AND R.L. CRAWFORD 1986. Response of the microflora in outdoor experimental streams to PCP : Environmental factors. *Can. J. of Microb.* 32, 38-45.
- POSTMA J., C.H. HOK-A-HIN AND J.H. OUDE VOSHAAR 1990. Influence of the inoculum density on the growth and survival of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* introduced into sterile and non-sterile loamy sand and silt loam. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73 : 49-58.
- PRIESACK E. AND G.M. KISSER-PRIESACK 1993. Modeling diffusion and microbial uptake of C-glucose in soil aggregates. *Geoderma*, 56 : 561-573.
- QUIOC B. 1990. Etude de la formation des biofilms dans un circuit de refroidissement expérimental. Application à l'évaluation de l'efficacité d'additifs et de revêtements. Thèse doctorale. U. C. B. LYON I. 164 p.
- RAMIREZ C AND M. ALEXANDER 1980. Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (*P. vulgaris*) *Appl. Environ. Microbiol.* 40 : 492-499.
- RAMOS J.L., E. DUQUE AND M.I. RAMOS-GONZALEZ 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1) : 260-266.
- RAMSAY A.J. AND A.D. BAWDEN 1983. Effects of sterilisation and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biol. Biochem.* 15 : 263-268.
- RAO K.R. 1978. Pentachlorophenol : chemistry, pharmacology and environmental toxicology. K.R. Rao (ed.) Plenum Press. New York.

- RASOLOMANANA J.L. AND J. BALANDREAU 1987.** Rôle de la rhizosphère dans la biodégradation de composés récalcitrants : cas d'une rizière polluée par des résidus pétroliers. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 24 (3) : 443-457.
- RAST H.G., G. ENGELHARDT AND P.R. WALLNÖFER 1980.** Degradation of aromatic compounds in the actinomycete-genus *Rhodococcus*. *FEMS Microbiol Lett* 7 : 1-6.
- RAYNER M.H. and SADLER P.J. 1989.** Cadmium accumulation and resistance mechanisms in bacteria. In "Metal Microbe Interactions". RK Poole and G.M. Gadd eds. IRL Press, Oxford. Vol 26, Special Public. of Soc. for Gen. Microbiol.
- RECORBET G. 1993.** Regulation d'une population d'*Escherichia coli* modifiée génétiquement et devenir de son ADN dans le sol. Thèse de l'UCB LYON I 127 p.
- RICHAUME A, J.S. ANGLE AND M.J. SADOWSKY 1989.** Influence of soil variables on *in situ* plasmid transfer from *Escherichia coli* to *rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1730-1734.
- RICHAUME A. 1992.** Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur le transfert de plasmides entre bactéries dans le sol. Thèse UCB LYON I 146 p.
- RICHTER O., NORTERSHEUSER P. and DIEKKRUGGER B. 1993.** Modeling reactions and movement of organic chemicals in soils by coupling of biological and physical processes. *Modeling Geobiosphere Processes* vol 1, p 95-114.
- ROBERT M. and CHENU C. 1992.** Interactions between soil minerals and microorganisms. In *Soil Biochemistry* vol. 7. ed. G. STOTZKY et J.M. BOLLAG, Marcel Dekker, Inc New York
- RUBIN H.E. AND M. ALEXANDER 1983.** Effect of nutrients on the rates of mineralization of trace concentrations of phenol and p-nitrophenol. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 17, n°2.
- RUCKDESCHEL G., G. RENNER AND K. SCHWAY 1987.** Effets of PCP and some of its known and possible metabolites on different species of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2689-2692.
- RUTHERFORD D.N. AND C.T. CHIOU 1992.** Effect of water saturation in soil organic matter on the partition of organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 26, 965-970.
- SABER D.L. and CRAWFORD R.L. 1985.** Isolation and caracterisation of *Flavobacterium* strains that degrade PCP. *Appl. Envir. Microb.*, 50 (6), 1512-1518.
- SABLJIC A. 1984.** Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic pollutants by Molecular Topology. *J. Agric. Food. Chem.*, 32 : 243-246.
- SABLJIC A. 1987.** On the prediction of soil sorption coefficients of organic pollutants from molecular structure : application of molecular topology model. *Environ. Sci. Technol.* 21 : 358-366.
- SALKINOJA-SOLOMEN M., MIDDELDORP P., BRIGLIA M., VALO R. HAGGBLOM M. and A. Mc.BAIN 1989.** Cleanup of old industrial sites. In "Advances in Applied Biotechnology", Vol. 4, ed. by D. Kamely, A. Chakrabarty and G. Omenn, GUL Publishing Company, Houston Tx, pp. 347-367.
- SARDIN M., SCHWEICH D., LEIJ F.J. and VAN GENUCHTEN M.Th. 1991.** Modeling the nonequilibrium transport of linearly interacting solutes in porous media : a review. *Water Resour. Res.* 27 (9) 2287-2307.
- SATO K. 1987.** Effet of increasing PCP concentrations on bacterial populations in glycine percolated soils. *Biol. Fertil. Soils.* 5 : 1-5.

- SAYLER G.S., R.K. JAIN, A. OGRAM, C.A. PETTIGREW, L. HOUSTON, J. BLACKBURN AND W.S. RIGGSBY 1986. Applications for DNA probes in biodegradation research. Proc. IV ISME 499-508.
- SCHONBORN W. AND K. DUMPERT 1990. Effects of PCP and 2,4,5T on the microflora of the soil in a beech wood. Biol. Fertil. Soils. 9 : 292-300.
- SCHELLENBERG K., LEUENBERGER C. and SCHWARZENBACH A.P. 1984. Sorption of chlorinated phenols by natural sediments and aquifer materials". Environ. Sci. Technol., 18 (9), p 652-657.
- SCHEUNERT I., Z. QIAO AND F. KORTE 1986. Comparative studies of the fate of atrazine-¹⁴C and Pentachlorophenol-¹⁴C in various laboratory and outdoor soil-plant systems. J. Environ. Sci. Health, B21(6), 457-485.
- SCHIAVON M., E. BARRIUSO, J.M. PORTAL, F. ANDREUX, J. BASTIDE, C. COSTE AND A. MILLET 1990. Etude du devenir de deux substances organiques utilisées dans les sols, l'une massivement (l'atrazine) et l'autre à l'état de trace (le metsulfuron-méthyl), à l'aide de molécules marquées au ¹⁴C. Rapport interne ENSAIA Nancy, CPB-CNRS Nancy, 75 p.
- SCHMIDT S.K., K.M. SCOW AND M. ALEXANDER 1987. Kinetics of p-Nitrophenol Mineralization by a *Pseudomonas* sp. : Effects of Second Substrates. Appl. Environ. Microbiol. 53 (11) : 2617-2623.
- SCHWEICH D. 1986. Cinétique des processus d'interactions solide-liquide dans les mécanismes d'interaction solide-liquide et leur modélisation : application aux études de migration en milieu aqueux. Chap. 2, IEAE-Tecd-367.
- SCHWEICH D. AND M. SARDIN 1981. Adsorption, partition, ion exchange and chemical reaction in batch reactors or in columns : a review. J. of Hydrol. 50 : 1-33.
- SCOW K.M. and ALEXANDER M. 1992. Effect of diffusion on the kinetics of biodegradation : Experimental results with synthetic aggregates. Soil Sci. Soc. Am. J. 56 p 128-134.
- SCOW K.M., SIMKINS S. and ALEXANDER M. 1986. Kinetics of mineralization of organic compounds at low concentrations in soil. Appl. Envir. Microbiol. vol 51, p 1028-1035.
- SEIBER J.N. 1987. Principles governing environmental mobility and fate. In "Pesticides: minimizing the risks". ACS Symposium Series n° 336.
- SELIM H.M., BUCHTER B., HING C. AND L. MA 1992. Modeling the transport and retention of cadmium in soils : Multireaction and Multicomponent Approches. Soil Sci. Soc. Am. J. 56 : 1004-1015.
- SHAIR S. 1971. Microbicide treatment of recirculating cooling water. Ind. Water Eng., 26-30.
- SIGG L., W. STUMM AND P. BEHRA 1992. Chimie des milieux aquatiques : Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Ed. Masson, Paris.
- SIMKINS S. AND M. ALEXANDER 1985. Nonlinear estimation of the parameters of Monod kinetics that best describe mineralization of several substrate concentrations by dissimilar bacterial densities. Appl. Environ. Microbiol. 50 (4) : 816-824.
- SLATER J.H., LOVATT D., WEIGHTMAN A.J. and BULL A.T. 1979. The growth of *Pseudomonas putida* on chlorinated aliphatic acids and its dehalogenase activity. J. Gen. Microb. 114, 125-136.
- SMART P. 1975. Soil microstructure. Soil Sci. 119 (5) : 325-404.

- SOBY S. AND K. BERGMAN 1983. Motility and chemotaxis of *Rhizobium meliloti* in soil. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 995-998.
- SPAIN J.C. AND P.A. VAN VELD 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds : Effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 428-435.
- SPAIN J.C. 1990. Microbial adaptation in aquatic ecosystems. In "Enhanced biodegradation of pesticides in the environment". A. C. S. Symposium Series.
- SPOSITO G. 1984. The surface chemistry of soils. Oxford university Press. New York.
- SPOSITO G. 1989. The chemistry of soils. Oxford University Press, New York
- STANLAKE G.J., FINN R.K., 1982. Isolation and characterisation of a PCP degrading bacteria. Appl. Envir. Microb. 44 (6), 1421-1427.
- STEINBERG C. 1987. Dynamique d'une population bactérienne introduite dans le sol : régulation par les protozoaires et modélisation mathématique de la relation de prédation *Bradyrhizobium japonicum*-amibes indigènes. Thèse UCB LYON I 113 B
- STEINBERG C., 1989. Techniques immunologiques. Rapport interne du laboratoire d'écologie microbienne.
- STEINBERG C., GROSJEAN M.C., BOSSAND B. AND G. FAURIE 1990. Influence of PCB's on the predator prey relation between bacteria and protozoa in soil. FEM's Microbiol. Ecol. 73 : 139-147.
- STOTZKY G. 1974. Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. In : "Microbial ecology". Edited by Laskin A.I. and Lechevalier H., CRC Press Inc., pp 57-135.
- STUMM W., R. KUMMERT AND L. SIGG 1980. A ligand exchange model for the adsorption of inorganic and organic ligand at hydrous oxide interfaces. Croat. Chem. Acta 52 : 291-312.
- STUMM W. 1992. Chemistry of the solid-water interface. Processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems. John Wiley & Sons, Inc.
- SUIDA J.F. and DE BERNARDIS A.C. 1973. Natural occurring halogenated organic compounds. Lloydia 36, 137-143.
- SUSLOW T.V., SCHROT H.M.N., and ISAKA M. 1982. Application of a rapid method for gram bacteria differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72. 917-918.
- SWIFT M.J., O.W. HEAL AND J.M. ANDERSON 1979. Decomposition in terrestrial ecosystems. Blackwell Scientific Publications Oxford.
- SWINDOLL C.M., AELION C.M. AND F.K. PFAENDER 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. App. Environ. Microbiol. 54 (1) : 212-217.
- TESSIER L. 1993. Contribution à l'étude et à la Modélisation du transfert et de la Biodégradation de Pesticides en Colonne de sol. DEA de Mécanique des Milieux Géophysiques et Environnement. Grenoble I.
- THIES J.E., P.W. SINGLETON AND B.B. BOHLOOL 1991. Influence of the size of indigenous *rhizobial* populations on establishment and symbiotic performance of introduced *rhizobia* on field-grown legumes. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 19-28.
- THOMAS J.M. AND C.H. WARD 1989. *In situ* bioremediation of organic contaminants in the subsurface. Environ. Sci. Technol., Vol. 23, n°23.

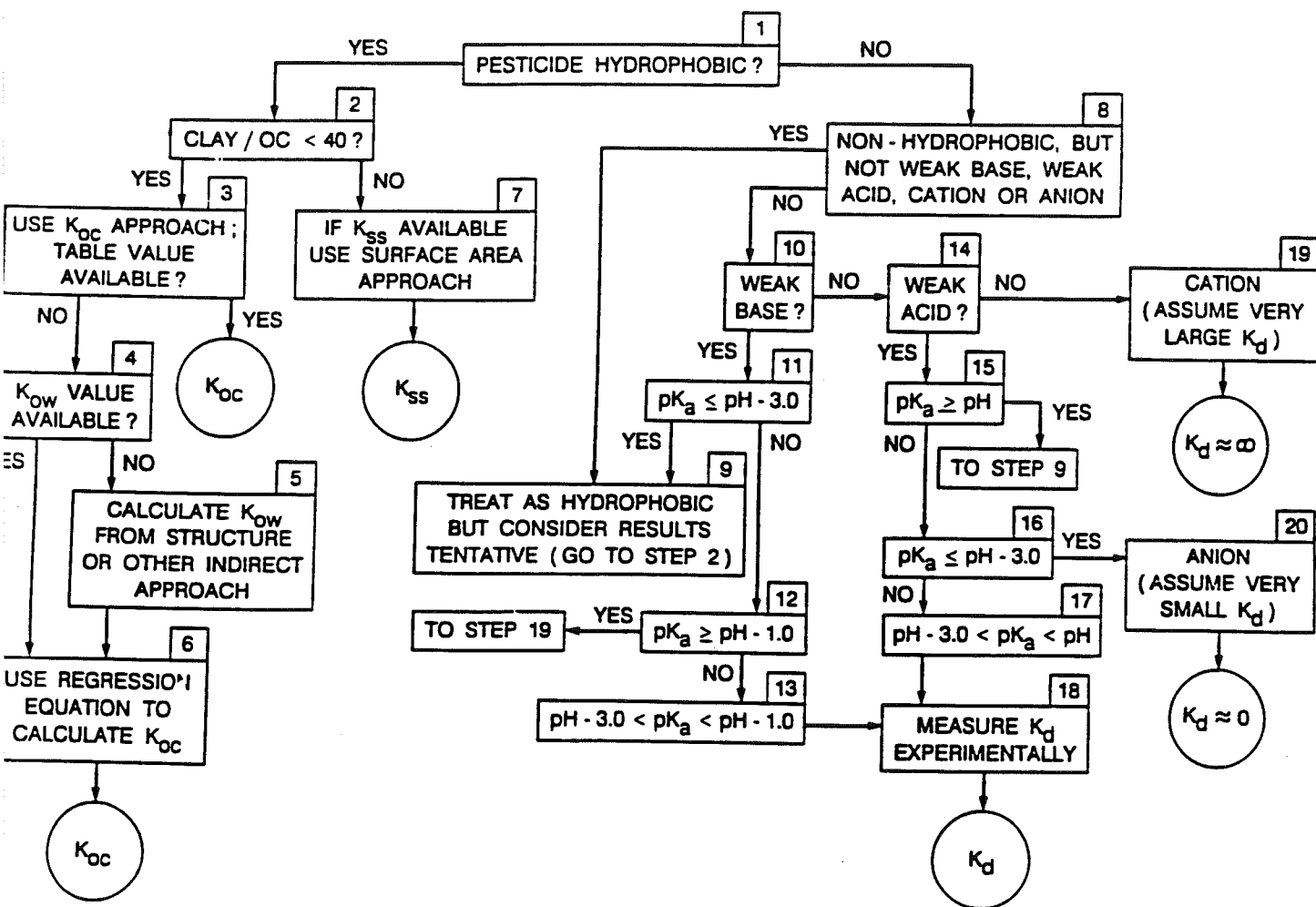
- THOMPSON I.P., K.A. COOK, G. LETHBRIDGE AND R.G. BURNS 1990.** Survival of two ecologically distinct bacteria (*Flavobacterium* and *Arthrobacter*) in unplanted and rhizosphere soil : laboratory studies. *Soil Biol. Biochem.* 22 : 1029-1037.
- THONY J.L. 1970.** Etude expérimentale des phénomènes d'hystérésis dans les écoulements en milieux poreux non saturés. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Grenoble 140 p.
- TISDALL J.M. AND OADES J.M. 1982.** Organic matter and water stable aggregates in soil. *J. Soil Sci.* 32 : 141-163.
- TOPP E., R.L. CRAWFORD AND R.S. HANSON 1988.** Influence of readily metabolizable carbon on Pentachlorophenol metabolism by a Pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (10) : 2452-2459.
- VACHAUD G. 1968.** Contribution à l'étude des problèmes d'écoulement en milieux poreux non saturés. Thèse de Docteur ès-Sciences Physiques à la Faculté des Sciences de l'Université de Grenoble.
- VALO R.J., M.M. HAGGBLOM AND M.S. SALKINOJA-SALONEN 1990.** Bioremediation of chlorophenol containing simulated ground water by immobilized bacteria. *Wat. Res.* 24 (2) : 253-258.
- VAN DER MEER J.R., W.M. DE VOS, S. HARAYAMA AND A.J.B. ZEHNDER 1992.** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.*, 56 p. 677-694.
- VAN ELSAS J.D., A.F. DIJKSTRA, J.M. GOVAERT AND J.A. VAN VEEN 1986.** Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48 : 151-160.
- VAN ELSAS J.D., J.T. TREVORS AND L.S. OVERBEEK 1991.** influence of soil properties on the vertical movement of microorganisms. *Biol. Fertil. Soils.* 10 : 249-255.
- VAN GENUCHTEN M.Th. and WIERENGA P.J. 1976.** Mass transfer studies in sorbing porous media. 1. Analytical solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol 40 n°4, p 473-480.
- VAN GENUCHTEN M.Th., 1980.** A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, vol. 44, pp. 892-898.
- VAN GENUCHTEN M.TH., WAGENET R.J. 1989.** Two-site/two-region models for pesticide transport and degradation: Theoretical development and analytical solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol. 53, n° 5, pp 1303-1310.
- VAN GESTEL M, R. MERCKS AND K. VLASSAK 1993.** Microbial biomass and activity in soils with fluctuating water contents. *Geoderma* 56 : 617-626.
- VAN VEEN J.A. AND J.D. VAN ELSAS 1986.** Impact of soil structure and texture on the activity and dynamics of the soil microbial population. *Proc. IV ISME*, 481-488.
- VANDEVIVERE P. AND P. BAVEYE 1992.** Saturated hydraulic conductivity reduction caused by aerobic bacteria in sand columns. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56 : 1-13.
- VAUCLIN M., VIEIRA S.R., VACHAUD G., NIELSEN D.R. 1983.** The use off cokriging with limited field soil observations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol. 47, n° 2, pp. 175--184.
- VENKATESWARLU K. 1993.** Pesticide interactions with Cyanobacteria in soil and pure culture. In "Soil Biochemistry". J.M. Bollag and G. Stotzky (eds) Vol. 8.
- VILLERMAUX 1981.** The chromatographic reactor. Percolation Processes. Theory and applications. A.E. Rodrigues and D. Tondeur (eds).
- VILLERMAUX J. 1982.** Génie de la réaction chimique. Conception et fonctionnement des réacteurs. Technique et Documentation (Lavoisier).

- WALLNOFER P.R. and ENGELHARDT G. 1985.** Aromatic and heterocyclic structures. In "Biotechnology" 6a Biotransformations, Kieslich K. ed.
- WARDEL J.N., C.M. BROWN AND B. FLANNIGAN 1983.** Microbes and surfaces. In "Microbes in their natural environments". J.H. Slater, R. Whittenbury and J.W.T. Wimpenny. Cambridge Univ. Press.
- WATANABE I. 1973,** Isolation of PCP decomposing bacteria from soil. Soil Sci. Plant Nutr. 19 (2), 109-116.
- WAUCHOPE R.D. 1987.** Tilted-bed simulation of erosion and chemical runoff from agricultural fields : II. Effects of formulation on atrazine runoff. J. Environ. Qual. 16 : 212-216.
- WELLER D.M. 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26 : 379-407.
- WESTALL J.C. 1985.** Influence of pH and Ionic strength on the aqueous-non aqueous distribution of chlorinated phenols. Environ. Sci. Technol. 19 : 193-198.
- WIGGINS B.A. AND M. ALEXANDER 1988.** Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 54 (11) : 2803-2807.
- WILKINSON H.T., R.D. MILLER AND R.L. MILLAR 1981.** Infiltration of fungal and bacterial propagules into soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 45 : 1034-1039.
- WORRALL V. AND R.J. ROUGHLEY 1991.** Vertical movement of *Rhizobium leguminosarum* BV. *trifolii* in soil as influenced by soil water potential and water flow. Soil Biol. biochem. 23 (5) : 485-486.
- YOUNG C.S. AND R.G. BURNS 1993.** Detection, survival and activity of bacteria added to soil. In "Soil biochemistry" Vol. 8. J.M. Bollag and G. Stotzky (eds). M. Dekker Inc. New York.
- YOUSSEF R.A., SKAMAZAWA AND M. CHINO 1989.** Distribution of microbial biomass across the rhizosphere of barley (*Hordenn Vulgare* L) in soils. Biol. Fertil. 7 : 341-345.
- ZARZICKI R. AND A. CHACUK 1993.** Absorption : fundamentals and applications. Pergamon Press Oxford.
- ZEHNDER A.J.B. 1992.** Biodegradation of xenobiotic compounds. Troisième congrès de la Société Française de Microbiologie. 21-24 avril, LYON (FRANCE).
- ZELLES L., EL-KABBANY S., SCHEUNERT I. AND K. FORTE 1989.** Effects of PCP-¹⁴C and HgCL₂ on the microflora of various soils in comparison to biodegradation and volatilisation. Chemosphere 19 : 1721-1727.

ANNEXES

ANNEXE 1

Schéma proposé par Green et Karickhoff (1990), permettant d'obtenir une estimation rapide des coefficients de partition liés au processus de fixation:



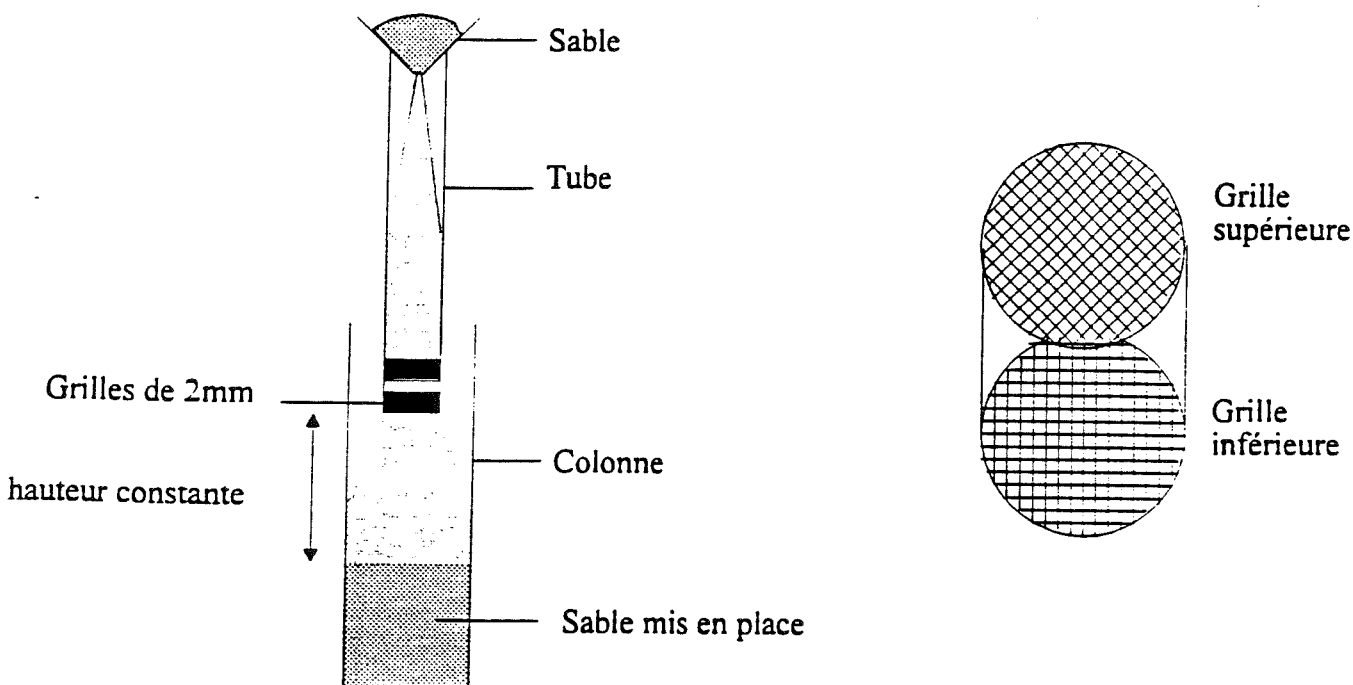
ANNEXE 2

Protocole de mise en place des milieux poreux dans les colonnes.

Mise en place du sable de Fontainebleau :

La mise en place du sable dans les colonnes s'effectue à sec selon une méthode standardisée qui permet d'obtenir une densité sèche très homogène et très reproductible dans toute la colonne. Avec ce sable on obtient en moyenne : $1,75 \text{ g.cm}^{-3} \pm 0,02$.

Le dispositif utilisé est représenté dans la figure suivante :



Le sable est placé dans un cône percé d'un trou de 3 à 4 mm de diamètre qui permet un écoulement régulier du sable et en faible quantité. Ce sable tombe alors sur un jeu de deux grilles entrecroisées ayant une maille de 2 mm, ce qui permet d'obtenir une répartition aléatoire des grains de sable dans la colonne. La hauteur entre le haut du sable en place dans la colonne et la dernière grille est maintenue constante pour que les grains aient tous la même énergie cinétique.

Mise en place du sol de la Côte Saint André :

La mise en place du sol dans les colonnes s'effectue avec le sol humide pour conserver intacte sa macrostructure et surtout pour préserver les microorganismes. Ceci implique d'effectuer une mesure préalable d'humidité pour pouvoir calculer la densité sèche du sol.

Il n'y a pas de protocole spécifique pour la mise en place d'un sol dans une colonne, nous avons donc adopté après mise au point, une technique qui permet d'obtenir une densité sèche du sol très reproductible. Elle consiste à introduire le sol dans la colonne par petites quantités à peu près constantes (10 à 15 g). Après chaque introduction de sol, celui-ci est mis en place à l'aide d'un outil plat d'environ 25 mm de largeur (du type réglet ou tournevis plat) en appliquant un nombre constant de coups pour chaque quantité de sol introduit.

Cette technique permet d'obtenir des densités sèches moyennes d'environ $1,3 \text{ g.cm}^{-3} \pm 0,05$.

En ce qui concerne les colonnes contenant *R. chlorophenolicus* sur tout le profil, l'inoculation s'effectue en pulvérisant une suspension bactérienne sur le sol étalé sur une surface stérile sur une faible épaisseur. Le sol est alors mélangé et introduit selon la technique décrite précédemment après avoir effectué une mesure d'humidité.

ANNEXE 3

Feuilles d'analyses du sol de La Côte Saint André.

Les analyses ont été effectuées par le centre EUROPE SOLS de Toulouse

Sol non stérile

Refus à 2 mm 3

. ANALYSE PHYSIQUE

(g par kg de terre sèche)

Sable grossier	159
Sable fin	135
Limon grossier	182
Limon fin	297
Argile	209
Matières organiques	18
Capacité d'échange (mé par Kg)	113,94
Calcaire total	
calcaire actif	
pH à l'eau	5,8
pH au KCL	5,0
Conductivité (mS/cm)	0,1240

. ANALYSE CHIMIQUE

(mg par Kg de terre sèche)

Anhydride phosphorique	P ₂ O ₅	
. méthode JORET-HEBERT		163
. méthode DYER		195
Anhydride sulfurique	SO ₃	48
Oxyde de calcium	CaO	1686
Oxyde de magnésium	MgO	108
Oxyde de potassium	K ₂ O	188
Oxyde de sodium	Na ₂ O	9

(mé par Kg) Ca = 60,0 Mg = 5,4 K = 4,0 Na = 0,3

Somme des cations = 69,6

FERTILITÉ CHIMIQUE

	DÉFICIT		NORMALE	EXCEDENT	
	IMPORTANT	FAIBLE		MODÉRÉ	ÉLEVÉ
P ₂ O ₅ JORET-HEBERT DYER			■ ■ ■		
K ₂ O			■		
MgO		■			

ÉQUILIBRES CHIMIQUE

$K_2O/MgO = 1.71$
 Ca/CEC = 52.66 Mg/CEC = 1.71 K/CEC = 3.52 Na/CEC = 0.25
 Saturation (S/T) = 61.13

Ca

Mg K Autres

CONDITIONS DE DÉVELOPPEMENT DES RACINES

	DÉFAVORABLES	RISQUÉES	FAVORABLES
Matières organiques		FAIBLES	
pH	ACIDR		

LIMON ARGILO-SABLEUX, ACIDE

Limons totaux/Argile = 2.29
 Sables/Argile = 0.76

Sol stérilisé par rayonnement gamma

Refus à 2 mm

3

. ANALYSE PHYSIQUE

(g par kg de terre sèche)

Sable grossier

160

Sable fin

159

Limon grossier

165

Limon fin

290

Argile

206

Matières organiques

20

Capacité d'échange (mé par Kg)

109,67

Calcaire total

calcaire actif

pH à l'eau

6,3

pH au KCL

5,7

Conductivité (mS/cm)

0,1697

. ANALYSE CHIMIQUE

(mg par Kg de terre sèche)

Anhydride phosphorique

P_2O_5

. méthode JORET-HEBERT

155

. méthode DYER

174

Anhydride sulfurique

SO_3

49

Oxyde de calcium

CaO

1677

Oxyde de magnésium

MgO

113

Oxyde de potassium

K_2O

200

Oxyde de sodium

Na_2O

5

(mé par Kg) Ca = 59,7 Mg = 5,6 K = 4,3 Na = 0,2

Somme des cations = 69,7

FERTILITÉ CHIMIQUE

	DÉFICIT		NORMALE	EXCEDENT	
	IMPORTANT	FAIBLE		MODÉRÉ	ÉLEVÉ
P ₂ O ₅ JORET-HERBERT DYER			■ ■ ■		
K ₂ O			■		
MgO		■			

ÉQUILIBRES CHIMIQUE

$K_2O/MgO = 1.77$
 (%) Ca/CEC = 54.42 Mg/CEC = 5.10 K/CEC = 3.89 Na/CEC = 0.14
 Saturation (S/T) = 63.55

Ca

Mg K Autres

CONDITIONS DE DÉVELOPPEMENT DES RACINES

	DÉFAVORABLES	RISQUÉES	FAVORABLES
Matières organiques		UN PEU FAIBLES	
pH		LÉGEREMENT ACIDE	

LIMON ARGILO-SABLEUX, LÉGEREMENT ACIDE

Limons totaux/Argile = 2.21
 Sables/Argile = 0.78

ANNEXE 4

Protocole utilisé pour les isothermes d'adsorption du PCP sur le sol de la Côte Saint André :

Cinétique de fixation :

Pour obtenir la courbe de cinétique de fixation, on met en contact une solution PCP à une concentration désirée et une masse de sol sec connue, en contrôlant la vitesse d'agitation du mélange (60 tours/mn), la température (28°C), la luminosité (obscurité) et la volatilisation (tubes fermés). Le rapport sol/solution de PCP est de 1/3 (en masse).

Au cours de l'agitation, des aliquotes de la suspension sont prélevées à des intervalles de temps réguliers.

Ces aliquotes sont alors centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes et le surnageant est utilisé pour les analyses par CLHP. On obtient ainsi la courbe de fixation au cours du temps pour une concentration donnée.

Isotherme d'adsorption :

La même opération est effectuée avec des solutions de PCP à diverses concentrations. Après équilibre (quand la concentration à l'équilibre ne varie plus) les suspensions sont centrifugées et analysées. On obtient ainsi une série de concentrations en PCP à l'équilibre. Connaissant les masses de PCP introduites, on peut représenter les concentrations dans la phase solide en fonction des concentrations à l'équilibre dans la phase liquide ($S = f(C_e)$).

ANNEXE 5

Isolement de plasmides par la méthode d'Eckhardt (1978) modifiée par Casse (1979).

- Préculture en milieu NB (Nutriment Broth).
- Culture de nuit en milieu NB (20 ml ou moins) ou en milieu TY, ou LB, jusqu'à une concentration de 10^8 cellule/ml environ.
- Prendre 1 ml de culture, et les mettre dans un tube eppendorf.
- Centrifuger 45 secondes (dans une centrifugeuse de paillasse, type Eppendorf, à la vitesse maxi).
Vider le surnageant.
Récupérer le culot avec 0,5 ml de Sarcosyl 0,1 % (dans du tampon TE8 pour laver les cellules).
Mélanger rapidement au Vortex.
- Centrifuger 45 secondes (dans la centrifugeuse de paillasse).
Vider le surnageant, et récupérer le culot dans 0,5 ml de TE8 (lavage pour éliminer le sarcosyl).
Remettre en suspension doucement au Vortex ou à la pipette.
- Centrifuger 45 secondes.
Vider le surnageant et ajouter 50 μ l de solution bleue (A), remettre en suspension rapidement (sans brutalité).
Déposer ensuite dans un puits du gel d'agarose 0,7%.
Attendre 10 minutes (on obtient ici des sphéroplastés).
- Ajouter doucement dans le puits 50 μ l de solution B avec un cône stérile (lyse des bactéries), remuer 3 fois (va et vient) avec un cure-dent stérile en bois, et ajouter 100 μ l de sol C.
- Sceller avec de l'agarose 0,7% les puits.
- Mettre le tampon pour électrophorèse.
- Allumer le générateur :
 - 1 h à 8 mA } en courant continu.
 - 3 h à 40 mA }
- Colorer l'ADN avec 0,4 μ g/ml de BET pendant 30 mn. Lire ensuite le gel sous éclairage U.V. (302 nm).

Les solutions utilisées :

1- TE pH 8 (0,05 M Tris, EDTA 0,02 M pH 8)

- Trizma Base PM 121,14 → 6,057 g → 0,05 M
 - EDTA disodique Merck (Réf. 84.18 Tritriplex III, PM : 372,24 g.mol⁻¹)
7,445 g → 0,02 M
- qsp 1 l. Le pH est ajusté à 8 avec HCl 1n.

2- Tris Borate. Tampon à électrophorèse pH 8,2

89 mM Tris, 2,5 mM EDTA Na₂, 89 mM acide Borique.
10,8 g Tris Base (89 mM)
0,93 g EDTA Na₂ (2,5 mM)
5,5 g Acide Borique (89 mM) (61,83 g → 1 M/l)
On ramène à pH 8,2 qsp 1 litre pour l'électrophorèse.
Ajout de 1,4% ou 0,7% Agarose.

3- Tampon Tris Borate 8,2

89 mM Tris Base → 10,8 g
12 mM EDTA Na₂ → 4,4668 g
89 mM Acide Borique → 5,5 g
qsp 1 litre → On ramène à pH 8,2

4- TE 8 Sarcosyl 0,1%

0,1 g de N Lauryl Sarcosine dans 100 ml de TE 8.

5- Solution A ou sol-Lysosyme

RNase I : 0,3 u/ml
Lysosyme 7500 u/ml
Bleu de Bromophénol 0,05%
Ficoll 20%
qsp de Tris Borate 8,2.
La RNase I doit être dissoute dans l'acétate de sodium 0,4 M
pH 4 à la concentration de 10 mg/ml
départ 41,100 u/mg de Lysozyme → pour 1 sol. de 10 ml à 7500
u/ml → 1,824 mg.
5 mg/10 ml de Bleu de Bromophénol (50 mg/10 ml)
dans tampon tris Borate 8,2
Ficoll 20% soit 20 g/100 ml.

6- Sol. B

SDS 0,2 g/100ml
Ficoll 10 g/100 ml

qsp Tris Borate pH 8,2

7- Sol. C

SDS 0,2 g pour 100 ml

Ficoll 5 g pour 100 ml, Tris Borate pH 8,2

8- Agarose 0,7% dans tampon électrophorèse.

9- Préparation de la RNase

Activité 81 u/mg.

Il faut 0,3 u/ml soit 3 u pour 10 ml.

donc 0,037 mg ou 37 μ g pour les 10 ml.

10 mg de RNase I sont dissouts dans 1 ml d'Acétate de sodium pH 4
et chauffé 2 mn à 98°C.

Il faut 30 u de RNase I dans 100 ml de milieu or, 10 mg/ml
(d'Acétate de sodium) pH 4 chauffé contiennent 810 unités.

donc 30 u correspondent à 0,037 ml soit à 40 μ l environ.

10 mg dans 1 ml Acétate de sodium pH 4

2 mn à 98°C

prélever 40 μ l à rajouter dans les 100 μ l de solution A.

ANNEXE 6

Numération microbienne du sol par immuno-fluorescence et coloration à l'acridine orange

- Peser 5 g de sol (pour teneur en eau) → 24 h à 100°C.
- Peser environ 10 g précisément.
- Broyer avec 70 ml d'eau distillée + rincage 30 ml.
- Pour Acridine orange (0,1%) :
 - . prélever 1 ml de solution de sol + 9 ml d'eau distillée
 - . préparer une batterie de dilutions
 - . ajouter 1 ml d'acridine orange à la dilution choisie
 - . filtrer sous vide
 - . rincer avec 10 ml H₂O distillé
 - . ajouter 1 ml d'isopropanol (décoloration du sol)
 - . rincer avec environ 3 ml H₂O distillé
 - . déposer sur lame pour observation, avec glycérine
- Pour immuno-fluorescence :
 - . ajouter 1 g de Ca(OH)₂/mgCO₃ au sol broyé (flocculant)
 - . prélever environ 10 ml de surnageant après 10 mn de floculation
 - . préparer une batterie de dilutions
- Sur lames microprint :
 - . déposer 2 fois 25 µl pour chaque dilution, sur lame
 - . sécher sous le séchoir
 - . fixer dans l'acétone (5 mn)
 - . déposer 25 µl de sérum anti-bactérien dans chaque puits
 - . incuber 20 mn à température ambiante sous atmosphère humide
 - . incuber 10 mn dans NaCl 0,9%
 - . rincer avec de l'eau distillée (2mn)
 - . sécher au séchoir
 - . déposer 25 µl de sérum de chèvre, anti lapin (1/100) dans chaque puits
 - . incuber 20 mn sous atmosphère humide
 - . incuber 10 mn dans NaCl 0,9%
 - . rincer avec de l'eau distillée, 2 mn
 - . sécher au séchoir
 - . déposer sur lame, avec glycérine.

- . Observation au microscope : déterminer la dilution à prendre pour avoir environ 5 bactéries par champ sur filtre

- Préparation du filtre :

- . déposer environ $7800 \times 5 = 3,9 \cdot 10^4$ bactéries sur le filtre (7800 = nombre de champs de microcosme)

- . transférer le filtre sur une lame de verre

- . ajouter 1 goutte de gélatine rhodamine, incubation (améliore les contrastes) 5 mn sous atmosphère humide

- . sécher la goutte sans sécher le filtre

- . ajouter le sérum anti-bactérien, incubation 20 mn sous atmosphère humide

- . transfert sur porte filtre, filtration, rinçage avec NaCl et eau distillé (50 ml)

- . transfert sur lame, ajouter le sérum de chèvre, incubation 20 mn sous atmosphère humide

- . transfert sur porte filtre

- . rincage NaCl 50 ml + eau distillé

- . sécher au séchoir

- . déposer sur lame pour observation → dénombrements.

ANNEXE 7

Table de Johnson et Kotz :

Calcul de l'intervalle de confiance de l'estimation d'une densité microbienne par immunofluorescence.

Observed number on which the estimate is based (n)	Lower limit factor (L)	Upper limit factor (U)	Observed number on which the estimate is based (n)	Lower limit factor (L)	Lower limit factor (U)
1	0.0253	5.57	35	0.697	1.39
2	0.121	3.61	40	0.714	1.36
3	0.206	2.92	45	0.729	1.34
4	0.272	2.56	50	0.742	1.32
5	0.324	2.33			
6	0.367	2.18	60	0.770	1.30
7	0.401	2.05	70	0.785	1.27
8	0.431	1.97	80	0.798	1.25
9	0.458	1.90	90	0.809	1.24
10	0.480	1.84	100	0.818	1.22
11	0.499	1.79	120	0.833	1.200
12	0.517	1.75	140	0.844	1.184
13	0.532	1.71	160	0.854	1.171
14	0.546	1.68	180	0.862	1.160
15	0.560	1.65	200	0.868	1.151
16	0.572	1.62	250	0.882	1.134
17	0.583	1.60	300	0.892	1.121
18	0.593	1.58	350	0.899	1.112
19	0.602	1.56	400	0.906	1.104
20	0.611	1.54	450	0.911	1.098
21	0.619	1.53	500	0.915	1.093
22	0.627	1.51	600	0.922	1.084
23	0.634	1.50	700	0.928	1.078
24	0.641	1.49	800	0.932	1.072
25	0.647	1.48	900	0.936	1.068
26	0.653	1.47	1000	0.939	1.054
27	0.659	1.46			
28	0.665	1.45			
29	0.670	1.44			
30	0.675	1.43			

ANNEXE 8

Résultats de la vérification du titre des sérums immunologiques des 4 souches dégradant le PCP et de leur spécificité (réactions croisées).

		DILUTIONS					
Souches	Serums	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
C2	C2	3	3	3	3	2	1
	C3	2	2	1	1	0	0
	C4	0	0	0	0	0	0
	SI	1	0	0	0	0	0
C3	C2	2	2	2	1	1	0
	C3	3	3	3	3	2	1
	C4	1	0	0	0	0	0
	SI	1	0	0	0	0	0
C4	C2	1	0	0	0	0	0
	C3	2	1	1	0	0	0
	C4	3	3	2	1	1	0
	SI	2	1	1	0	0	0
SI	C2	1	0	0	0	0	0
	C3	2	1	0	0	0	0
	C4	1	0	0	0	0	0
	SI	3	3	3	3	2	1

3 = Fluorescence intense

2 = Fluorescence moyenne

1 = Fluorescence faible

0 = Aucune fluorescence

ANNEXE 9

Résultats du test d'identification API 50 de *Rhodococcus chlorophenolicus* (d'après Apajalahti 1986) :

SUBSTRAT	CROISSANCE	SUBSTRAT	CROISSANCE
érythritol	+	maltose	-
L-arabinose	+	glycerol	-
ribose	+	D-arabinose	-
D-xylose	+	L-xylose	-
adonitol	+	β -methyl-D-xyloside	-
glucose	+	galactose	-
fructose	+	mannose	-
rhamnose	+	sorbose	-
inositol	+	dulcitol	-
mannitol	+	α -méthyl-D-mannoside	-
sorbitol	+	α -méthyl-D-glucoside	-
N-acétyl-glucosamine	+	amygdaline	-
arbutine	+	esculine	-
sucrose	+	glycogène	-
L-arabitol	+	gentiobiose	-
gluconate	+	D-turanose	-
trehalose	+	D-lyxose	-
xylitol	+	D-tagatose	-
D-arabitol	+	lactose	-
D-fucose	-	melibiose	-
L-fucose	-	inuline	-
salicine	-	mélésitose	-
cellobiose	-	raffinose	-
5-ketogluconate	-	amidon	-
2-ketogluconate	-		

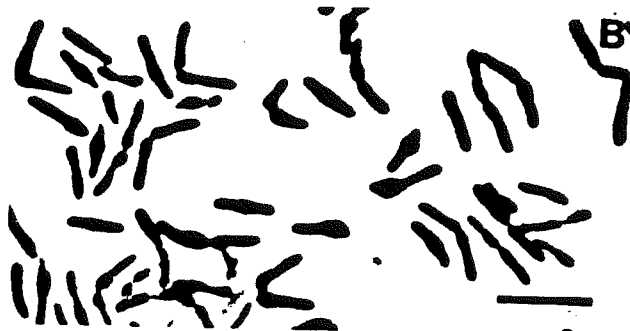
ANNEXE 10

Cycle morphologique de *Rhodococcus chlorophenolicus* cultivé sur milieu glucosé avec extrait de levure gélosé à 28°C (D'après Apajalahti 1986):

Après 0 h



Après 12 h



Après 2 jours



Après 4 jours



Après 7 jours



5 μ m

ANNEXE 11

Isolement et purification de plasmides par la méthode de lyse alcaline

1 - Pour les cultures liquides :

Centrifuger 1 à 1,5 ml de culture 1 mn avec la centrifugeuse de paillasse, éliminer la totalité du surnageant et reprendre le culot dans 100 μ l de la solution I contenant 10 mg/ml de lysozyme. Incuber 30 mn à 37°C.

2 - Ajouter 200 μ l de la solution II. Mélanger doucement par inversion (*1) (ne pas vortexer) et incuber 5 mn dans la glace.

3 - Ajouter 150 μ l de la solution III, mélanger doucement par inversion (*2) (ne pas vortexer) et incuber 5 mn dans la glace.

4 - Centrifuger au moins 5 mn. Récupérer le surnageant (400 μ l) et le transférer dans un tube neuf.

5 - Extraire le surnageant avec 100 μ l de phénol-chloroforme isoamylalcool saturé pH8 (vortexer). centrifuger 5 mn à la centrifugeuse de paillasse.

6 - Transférer la phase supérieure aqueuse dans un tube neuf et ajouter 800 μ l (maximum) d'éthanol à 95%, vortexer, incuber 2 mn à température ambiante.

Centrifuger au moins 10 mn, éliminer la totalité du surnageant.

7 - Reprendre le culot dans 50 μ l d'acétate d'ammonium 0.1M. Ajouter 150 μ l d'éthanol à 95%. Vortexer. Incuber 2 mn à température ambiante.

8 - Centrifuger 10 mn. Eliminer la totalité du surnageant. Rincer à l'éthanol absolu. Centrifuger 2 mn. Eliminer la totalité du surnageant et sécher.

9 - Resuspendre dans 50 à 100 μ l de Tampon TE contenant 20 μ g/ml de RNase.

10 - Utiliser suivant les cas 5 à 15 μ l pour les digestions enzymatiques.

Solution I

E. coli

50 mM glucose

25 mM Tris pH8

10 mM EDTA

Streptomyces

0,3 M sucrose

25 mM Tris pH8

25 mM EDTA

Lysosyme à 10 mg/ml

Solution II

0,2 N NaOH fait frais chaque fois
1% SDS

Solution III

3 M Acétate de Potassium amené à pH 4,8 avec de
l'acide acétique.

Remarques :

*1 : le mélange s'éclaircit et devient visqueux.

*2 : A ce stade on précipite les grosses molécules:
ADN chromosomique et protéines. Il ne faut pas vortexer pour ne pas les
briser.

ANNEXE 12

Les caractéristiques des colonnes de sol utilisées

Définitions

Les colonnes remplies de milieu poreux (annexe 2) sont caractérisées par :

- la masse volumique sèche ρ_d (g.cm⁻³) définie comme :

$$\rho_d = \frac{m}{V_T}$$

avec m = masse du matériau poreux (g)

V_T = volume total occupé par la hauteur L du milieu poreux (cm³)

- la porosité n ,

$$n = \frac{V_p}{V_T}$$

ou

$$n = \frac{\rho_s - \rho_d}{\rho_s}$$

avec V_p = volume poral (volume des vides) (cm³)

ρ_s = masse volumique des grains solides (g.cm⁻³)

pour le sable, $\rho_s = 2,7$ g.cm⁻³ et pour le sol $\rho_s = 2,6$ g.cm⁻³

- la teneur volumique en eau θ (cm³.cm⁻³)

$$\theta = \frac{V_o}{V_T}$$

avec V_o = volume d'eau infiltré dans la colonne

- la teneur volumique en eau mobile θ_m (cm³.cm⁻³)
- la teneur volumique en eau immobile θ_{im} (cm³.cm⁻³)
- la vitesse de Darcy q (cm.h⁻¹)

$$q = \frac{Q}{S}$$

avec Q = débit (cm³.h⁻¹)

S = surface transversale de la colonne (cm²)

- la vitesse de pore v (cm.h⁻¹)

$$v = \frac{q}{\theta}$$

- la vitesse de l'eau mobile v_m (cm.h⁻¹)

$$v_m = \frac{q}{\theta_m}$$

- le temps adimensionnel :

volume écoulé / volume d'eau dans la colonne (V/V_o).

- la concentration adimensionnelle :

concentration à la sortie / concentration à l'entrée (C/C_o).

Tableau récapitulatif des caractéristiques des colonnes de sol utilisées :

Les colonnes de sable de Fontainebleau :

	saturé		non saturé		+ R. chlorophenolicus	
Numéro	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	
\varnothing (cm)	5	5	5	2,6	2,6	
L (cm)	43,9	31,9	36	12,5	18,9	
ρ_d (g.cm ⁻³)	1,74	1,76	1,76	1,56	1,68	
Porosité n	0,36	0,35	0,35	0,42	0,38	
θ (cm ³ .cm ⁻³)	0,35	0,30	0,28	0,23	0,41	0,37
$V = q/\theta$ (cm.h ⁻¹)	# 0,5 # 1,8 # 5,6 # 12	# 0,6 # 1,75	24	17,4	# 5,3	# 0,76
q (cm.h ⁻¹)	# 0,2 # 0,6 # 2 # 4	# 0,2 # 0,5	6,7	4	# 2,18	# 0,24

Les colonnes de sol de la Côte Saint André :

	non stérilisé			stérilisé		
Numéro	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6
\varnothing (cm)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
L (cm)	19	18,4	19	16	18	20
ρ_d (g.cm ⁻³)	1,31	1,32	1,31	1,35	1,38	1,34
Porosité n	0,50	0,49	0,50	0,48	0,47	0,48
θ (cm ³ .cm ⁻³)	0,49	0,48	0,49	0,47	0,46	0,47
$V = q/\theta$ (cm.h ⁻¹)	1,36	0,51	0,65	0,44	0,52	0,7
q (cm.h ⁻¹)	0,67	0,24	0,316	0,21	0,24	0,329

ANNEXE 13

Protocole de dosage des ions chlorures en solutions :

Les chlorures sont dosés en milieu neutre par une solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium (indicateur coloré).

Réactifs :

- Solution de chromate de potassium à 10%.
- Solution de nitrate d'argent N/10.
 $\text{AgNO}_3 \rightarrow 17,3 \text{ g.}$
eau distillée \rightarrow q.s.p. 1 l.

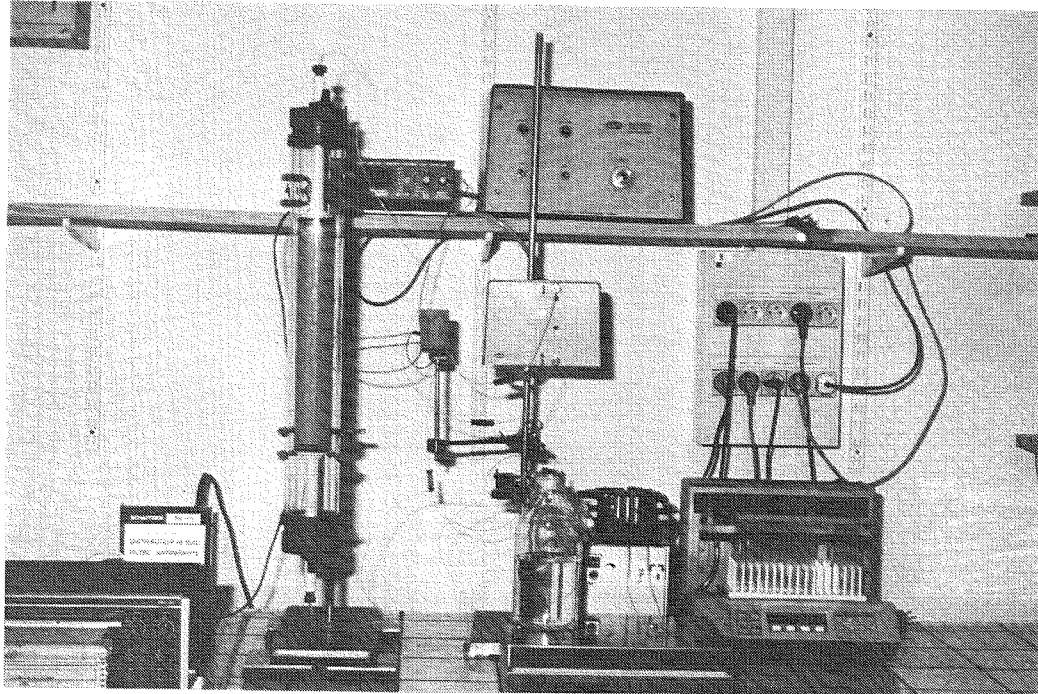
Mode opératoire :

- Introduire 4 ml de la solution à analyser dans un Erlen meyer de 250 ml.
- Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Ajouter 0,5 ml de chromate de potassium.
- A l'aide d'une burette, ajouter la solution de nitrate d'argent goutte à goutte.
- La neutralisation complète des ions chlorures est atteinte lorsqu'une teinte rougeâtre persistente apparaît.

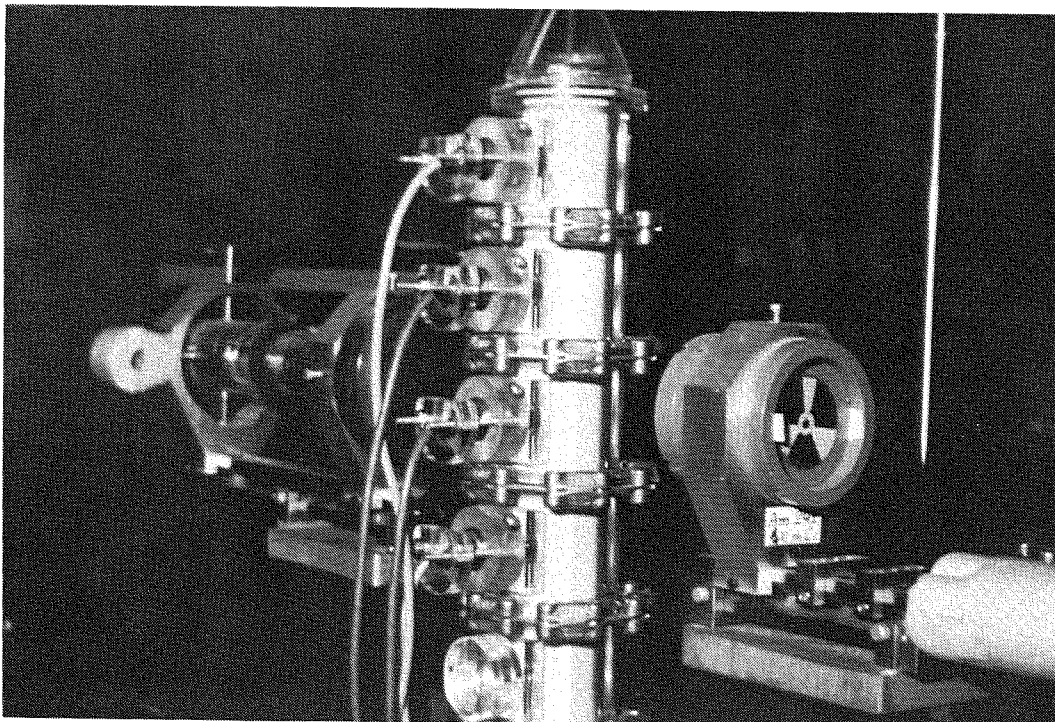
L'étalonnage est effectué avec des solutions de KCl de concentrations inférieures à 1 g.l^{-1} , le blanc est l'eau distillée utilisée précédemment.

ANNEXE 14

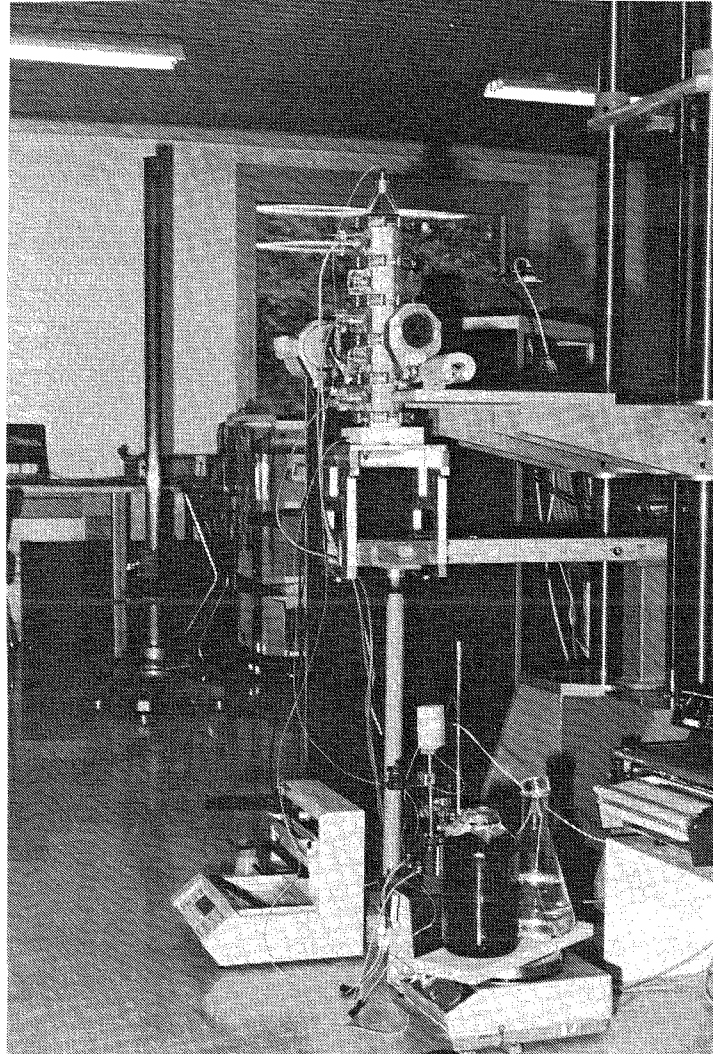
a/ Dispositif de transfert de solutés en colonne de sable saturé en eau :



b/ Dispositif de mesure de la teneur en eau par gammamétrie :



c/ Dispositif de transfert de solutés en colonne de sable non saturé en eau :

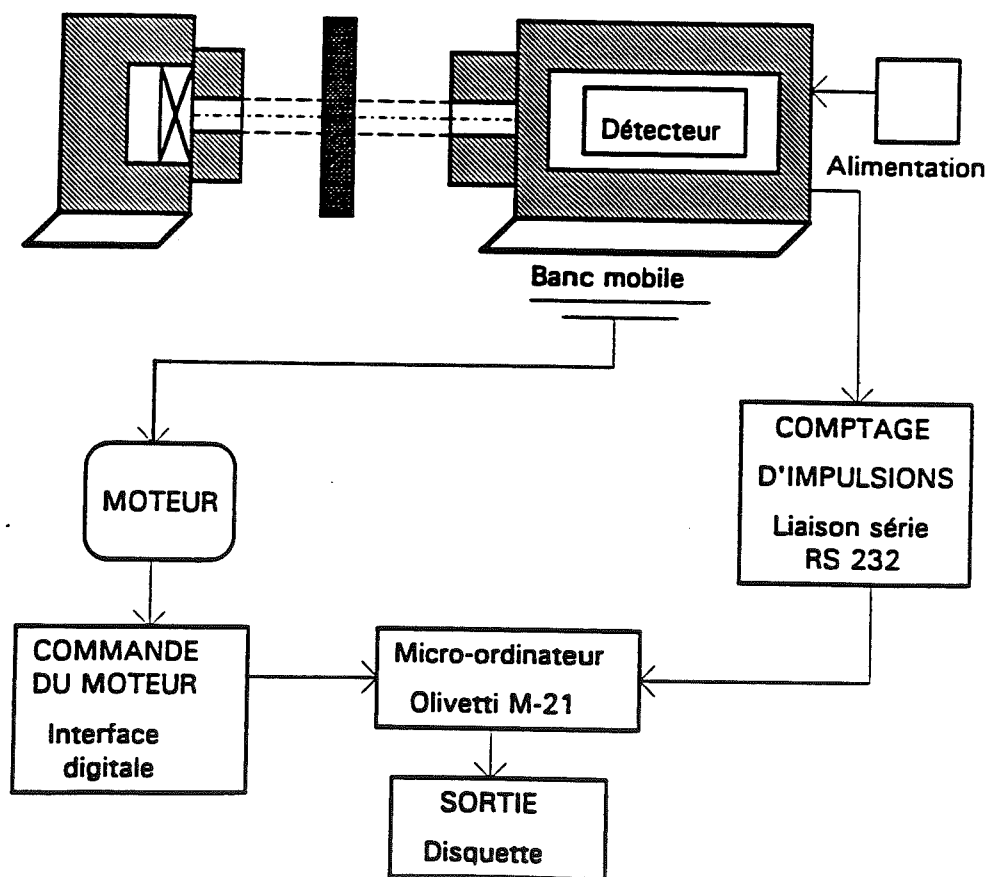


ANNEXE 15

Le pilotage du modèle physique de l'acquisition des données a été effectué sur un micro-ordinateur (Olivetti M21) équipé d'une interface digitale analogique Analog Devices RTI-800 et d'un programme pour l'acquisition automatique des données adapté du travail de Bellini (1992). Un schéma du dispositif pour le pilotage du système est présenté sur la figure ci dessous. Le logiciel suit la séquence d'opérations suivantes :

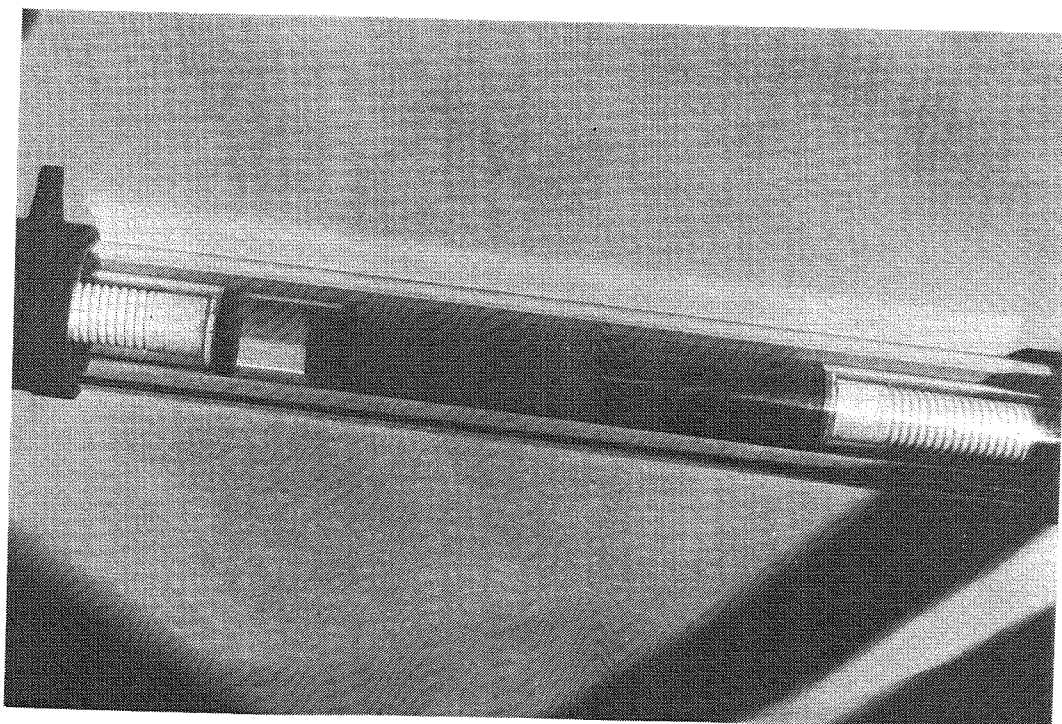
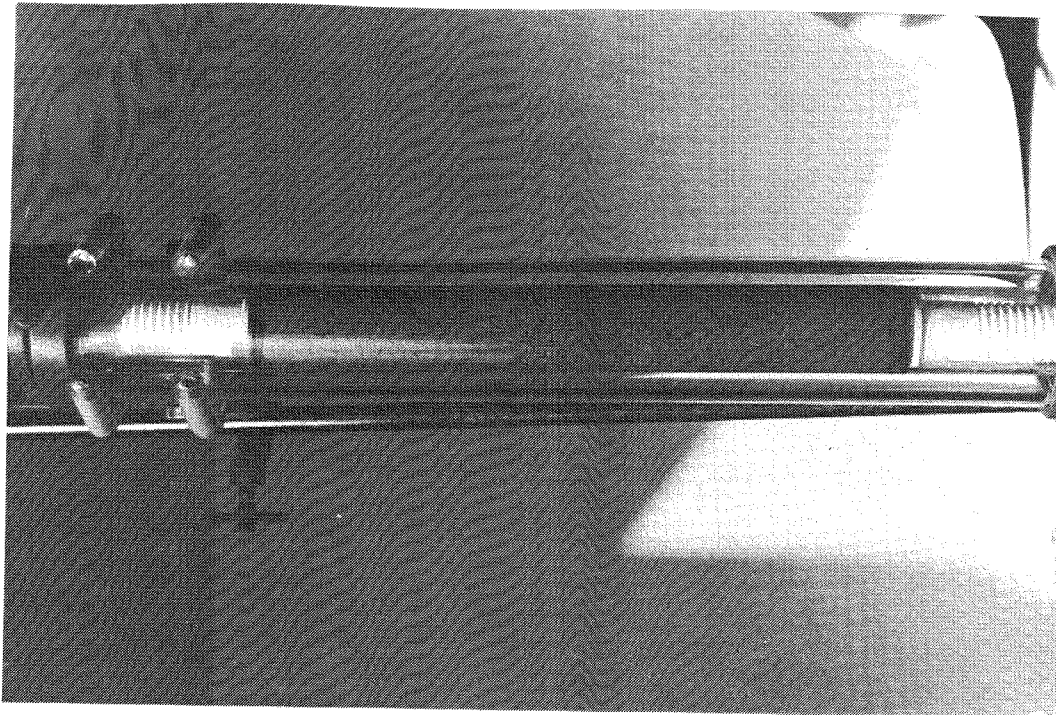
- 1- comptage à travers un standard pour contrôler une éventuelle dérive de l'ensemble source-détecteur-échelle de comptage au cours du temps ;
- 2- déplacement du banc à une cote présélectionnée ;
- 3- scrutation gammamétrique ;
- 4- stockage des données brutes sur disquette.

Les étapes 2 et 4 sont répétées jusqu'à ce que toute la hauteur de la colonne soit couverte. Le retour au standard démarre un nouveau cycle de scrutation.



ANNEXE 16

Lessivage et colmatage des colonnes de sol cultivé au cours de l'écoulement :



Titre de l'ouvrage :

LES ASPECTS HYDRODYNAMIQUES, PHYSICO-
CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DU DEVENIR DES
PESTICIDES DANS LES SOLS : APPLICATION AU
TRANSFERT DU PCP EN COLONNES

Nom de l'auteur : Joao MARTINS

Etablissement : Université Joseph Fourier-Grenoble I
Laboratoire d'étude des Transferts en Hydrologie et
Environnement

La prédiction du devenir des produits chimiques dans les sols est basée sur la description de nombreux mécanismes dont l'étude est pluridisciplinaire : microbiologie, hydrologie, pédologie, génie des procédés, géochimie et modélisation mathématique. L'approche choisie est de type dynamique des systèmes permettant le découplage des mécanismes sur colonnes de sols en laboratoire, soumises à différentes conditions initiales et aux limites contrôlées. L'étude cible les interactions physico-chimiques, le transport hydrodynamique et la biodégradation du pentachlorophénol (PCP) dans un sol brun lessivé sous culture de maïs et dans un sable. Les principaux mécanismes d'interaction du PCP avec les matrices solides ont été caractérisés en parallèle sur colonne et en systèmes fermés, mettant en évidence l'importance de la matière organique, du pH et de la teneur en eau immobile dans la régulation de ces interactions. Quatre souches bactériennes capables de dégrader le PCP ont été isolées. Après un an de conservation, ces souches ont perdu leurs capacités de dégradation, ce qui nous a conduit à utiliser une bactérie connue: *Rhodococcus chlorophenolicus* pour l'étude du comportement des microorganismes en microcosmes et en colonnes de sol. Les résultats expérimentaux concernant un traceur de l'écoulement (Cl^-) et le PCP ont été confrontés à une modélisation mathématique pour vérifier les hypothèses émises. Les mécanismes prépondérants que nous avons identifiés sont : le transport convectif, qui varie avec la nature, le degré d'humidité de la matrice solide poreuse et les vitesses d'écoulement de l'eau; les interactions physico-chimiques, qui dépendent du pH et du taux de matière organique; la biodégradation, régulée par de nombreux facteurs biotiques comme la distribution microscopique des microorganismes, les phénomènes d'adaptation ainsi que par la dynamique des populations introduites (prédation et compétition); le transport particulaire qui dépend des variations de composition et de force ionique de la solution du sol et qui peut être très important dans les sols lessivés en cas de forts épisodes pluvieux. Ce dernier mécanisme n'a pas été modélisé.

MOTS CLES

Transfert de solutés; Traceur; Interactions physico-chimiques, Biodégradation; Sols non saturés; Modélisation; Pentachlorophénol; *Rhodococcus chlorophenolicus*.